Aus dem Institut für
Parasitologie und Tropenveterinärmedizin
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Der Einfluß einiger Chemotherapeutika auf verschiedene biologische Eigenschaften Theileria annulata (DSCHUNKOWSKY und LUHS, 1904)-befallener lymphoblastoider Kulturzellen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Sabine Sanft
Tierärztin aus Berlin

Berlin 1985
Journal-Nr. 1223

Aus dem Institut für
Parasitologie und Tropenveterinärmedizin
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Der Einfluß einiger Chemotherapeutika auf verschiedene biologische Eigenschaften Theileria annulata (DSCHUNKOWSKY und LUHS, 1904)-befallener lymphoblastoider Kulturzellen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Sabine Sanft
Tierärztin aus Berlin

Berlin 1985
Journal-Nr. 1223

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Fachbereichssprecher:	Prof. Dr. F. Hörchner
Referent:	Prof. Dr. E. Schein
Korreferent:	Prof. Dr. V. von Bülow

Tag der Promotion: 3. Mai 1985

Meinen Eltern gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547201_0079

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN ANHAND DER LITERATUR	2
2.1. Taxonomie, Verbreitung und Entwicklung von Theileria annulata	2
2.2. Immunabwehr der Rinder gegen Theilerien	4
2.3. Differenzierung und Charakterisierung der Lymphozyten	7
2.3.1. Ontogenese der Lymphozyten	7
2.3.2. Charakterisierung der Lymphozyten anhand ihrer Oberflächenmembranrezeptoren	9
2.3.3. Das Major Histocompatibility System (MHS) und seine Rolle in der Mixed Lymphocyte Reaction (MLR)	12
2.4. Kultivierung und Charakterisierung Theilerien-Schizonten-befallener Zellen	16
2.5. Chemotherapie	18
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	22
3.1. Material und Methoden	22
3.2. Ergebnisse	33
3.2.1. Einfluß der Chemotherapeutika auf den Index und die Partikelanzahl der Theileria annulata-Schizonten und auf die Vitalität der Parasiten und ihrer Wirtszellen	33

3.2.2. Einfluß der Chemotherapeutika auf die Stimulationsfähigkeit Theileria annulata-befallener Kulturzellen 39

3.2.3. Einfluß der Chemotherapeutika auf die Stimulierbarkeit Theileria annulata-befallener Kulturzellen durch Mitogene 47

3.2.4. E-, EA- und EAC-Rosettenbildung unbehandelter bzw. behandelter Theileria annulata-infizierter Kulturzellen 52

4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE 66

5. ZUSAMMENFASSUNG - SUMMARY 73

6. LITERATURVERZEICHNIS 77

2. Theoretische Grundlagen anhand der Literatur

2.1. Taxonomie, Verbreitung und Entwicklung von Theileria annulata

Die Verbreitung von Theileria annulata, einem Protozoon aus der Gattung Theileria des Unterstammes Apicomplexa, reicht von Süd-Europa, Nord-Afrika, dem Mittleren Osten, dem Süden der UdSSR bis nach Indien.
Die Überträger von T. annulata sind Zecken der Gattung Hyalomma. Bis heute sind sechs verschiedene Zeckenarten als Vektoren für Theilerien bekannt. Hyalomma scupense (SCHULZE, 1919), Hyalomma dromedarii (KOCH, 1844), Hyalomma anatolicum excavatum und Hyalomma anatolicum anatolicum (KOCH, 1844), Hyalomma impressum (KOCH, 1844), Hyalomma marginatum (KOCH, 1844) und Hyalomma turanicum (POMERANTZEV, 1946).
Aufgrund des weiten Verbreitungsgebietes der Vektorzecken fehlen genaue Angaben über das gesamte Ausmaß der durch T. annulata verursachten wirtschaftlichen Verluste. In Gebieten mit einer starken Zeckenpopulation und folglich einer hohen Erregerdichte herrscht zwar eine hohe Morbidität; es verenden allerdings nur wenige einheimische Tiere an den direkten Folgen der Erkrankung. Die Theileriose läuft hier in der Regel subklinisch ab (BARNETT, 1968). Bei eingeführtem europäischen Hochleistungsvieh wird dagegen meist das akute Erkrankungsbild beobachtet. Diese infizierten Importrinder erreichen eine Letalitätsrate von nahezu 100% (WIESENHÜTTER, 1965). Vermutlich besitzen Rinderrassen, die sich im Laufe ihrer Evolution mit den Erregerstämmen auseinandersetzen mußten, eine gewisse Resistenz gegenüber der Mittelmeertheileriose.

Der Entwicklungszyklus von T. annulata in Hyalomma anatolicum excavatum wurde von SCHEIN (1976) untersucht. Er konnte im Darmlumen der T. annulata-infizierten Hyalomma-Nymphen eine

sexuelle Entwicklung, die Gamogonie, nachweisen. Im Anschluß daran entwickeln sich Zygoten, die sich während der Metamorphose der Zecken zu Kineten differenzieren, die nunmehr die Speicheldrüsen befallen. Nach Häutung von der Nymphe zur adulten und einer erneuten Blutmahlzeit entwickeln sich in den Speicheldrüsen der Zecken Sporoblasten, aus denen nach drei bis fünf Tagen Saugdauer die Sporozoiten entstehen. Nach SCHEIN (1976) sowie SAMISH und PIPANO (1976) ist T. annulata nur transstadial übertragbar. Die Sporozoite werden mit dem Zeckenspeichel in die Saugwunde abgegeben und stellen das infektiöse Stadium für das Rind dar.

Zunächst sind die Erreger im lymphatischen System nicht nachweisbar und treten erst nach sechs bis zehn Tagen als Makroschizonten, den sogenannten KOCH'schen Kugeln, in den Lymphozyten des Rindes auf. Die befallenen Zellen transformieren sich zu großen Lymphoblastoidzellen und werden durch die Makroschizonten zu einer verstärkten Mitose angeregt. Synchron mit der Wirtszellteilung erfolgt die Schizontenvermehrung. Die Makroschizonten entwickeln sich später zu Mikroschizonten, die eine große Anzahl Merozoite enthalten. Durch das Platzen der Wirtszelle verlassen die Merozoite die Zellen und befallen anschließend die Erythrozyten des Wirtes. Intraerythrozytär treten sie dann als kleine, kommaförmige oder runde Parasiten auf, die sich durch Zweiteilung weiter vermehren können. Zu einem erneuten Befall der Lymphozyten kommt es normalerweise nicht mehr. Nur in Ausnahmefällen, d.h. bei einer deutlichen Verschlechterung des Allgemeinzustandes des Rindes, beispielsweise aufgrund einer zusätzlichen Infektion mit anderen Erregern, können wiederholt Lymphozyten durch den Parasiten befallen werden. Die mit T. annulata infizierten Tiere bilden zeitlebens das Erregerreservoir, an dem sich die Zecken anstecken können. Die intraerythrozytären Stadien werden bei der Blutmahlzeit von den Zeckenlarven oder -nymphen aufgenommen, in denen die Erreger ihre Entwicklung erneut beginnen.

2.2. Immunabwehr der Rinder gegen Theilerien

Der Versuch, Rinder experimentell gegen Theilerien zu immunisieren, wurde seit Beginn der vierziger Jahre wiederholt unternommen (SERGENT et al., 1932; DELPY, 1949; ADLER, 1952). Nach NEITZ (1957) sind Tiere, die eine T. annulata-Infektion überstanden haben, auch nach dem Abklingen der Krankheitssymptome noch latente Parasitenträger, die eine zuverlässige "Prämunität" besitzen.
Die Immunantwort richtet sich in diesem Fall nicht nur gegen die spezifische Theilerienart (NEITZ, 1957; BARNETT, 1963, 1968). Es scheinen außerdem auch stammesbedingte Antigenunterschiede zu existieren, die sich durch eine bessere Infektabwehr von T. annulata-rekonvaleszenten Tieren gegen den homologen als gegen den heterologen Stamm demonstrieren lassen (SERGENT et al., 1945; RAFYI et al., 1965; PIPANO, 1974).
Wird allerdings der Organismus eines Rindes, das sich von den Folgen des Mittelmeerfiebers erholt hat, durch Vakzinierungen z.B. gegen Rinderpest und gegen Milzbrand, oder auch durch andere Infektionskrankheiten wie Babesiose bzw. MKS belastet, kann die Theilerienabwehr zum Erliegen kommen (DSCHUNKOWSKY und LUHS, 1904; GRIMPET, 1937).

Bei der Immunantwort auf eine T. annulata-Infektion wird in erster Linie eine Sensibilisierung und Aktivierung von Lymphozyten beobachtet. Allerdings berichten einige Autoren auch über die Bildung humoraler Antikörper.
In Rindern, denen lebende oder abgetötete T. annulata-Schizonten appliziert worden waren, konnten PIPANO und CAHANA (1968) sowie GOLDMANN und PIPANO (1978) mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion, der indirekten Hämagglutination und des Immunfluoreszenztestes nachweisen, daß die Bildung von Antikörpern bereits während der akuten Phase der Infektion einsetzt, der höchste Titer aber erst nach dem Abklingen der klinischen Symptome erreicht wird.

Eine maximale Konzentration von Immunglobulinen im Blut zu einem Zeitpunkt, an dem keine Krankheitserscheinungen mehr festzustellen waren und Schizonten überhaupt nicht und Merozoite nur noch in geringer Anzahl nachweisbar waren, beobachtete REHBEIN (1981) bei der Durchführung der Raketenimmunelektrophorese.
Eine Übertragung von Immunsera T. annulata-befallener Tiere bewirkte aber weder einen zuverlässigen Infektionsschutz noch eine Beeinflussung des Krankheitsverlaufes bei gesunden Tieren (BARNETT, 1968; PIPANO, 1976).
In vitro konnte dagegen sowohl die Infektion der Lymphozyten mit T. annulata-Sporozoiten als auch die Transformation der Kulturzellen zu Schizonten enthaltenden Lymphoblastoidzellen durch den Zusatz von Serum immuner Rinder verhindert werden (GRAY und BROWN, 1981).

Bis heute wurden noch keine Lymphozyten T. annulata-immuner Spendertiere gesunden Rindern appliziert. Allerdings weisen zahlreiche in vitro-Versuche darauf hin, daß die zellabhängige Immunabwehr bei der T. annulata-Infektion eine wesentliche Rolle spielt.
Erstmalig wurde die zellvermittelte Immunität bei T. annulata von SINGH et al. (1977) demonstriert, die periphere Leukozyten rekonvaleszenter Rinder durch das Zufügen von Merozoitenantigen zur Produktion eines Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Faktors angeregt hatten. Die Wanderung von Leukozyten, die aus negativen Kontrolltieren gewonnen worden waren, konnte trotz Zusatz des Antigens nicht gehemmt werden.
Einen Makrophagen-Migrations-Hemm-Faktor wiesen REHBEIN et al. (1981 b) nach, nachdem sie Lymphozyten von Kälbern, die mit T. annulata infiziert worden waren, mit Merozoiten- bzw. Schizontenantigen stimuliert hatten. Gleichzeitig stieg nicht nur die Zahl der EA- und EAC-Rosetten bildenden Lymphozyten als Ausdruck der humoralen Antwort, sondern auch die der Spontanrosetten formenden, für die zellvermittelte Immunität charakteristischen T-Zellen an (REHBEIN et al., 1981 a). Daß periphere Blutlymphozyten (PBL) an der Immunabwehr T. annulata-infizier-

ter Rinder maßgeblich beteiligt sind, demonstrierte FRESE (1983) in vitro mit Hilfe der Mixed Lymphocyte Reaction (MLR). Er inkubierte T. annulata-infizierte Kulturzellen gemeinsam mit PBL, wobei sich sowohl autologe, d.h. vom gleichen Rind stammende, als auch allogene, also von einem anderen Individuum der gleichen Tierart isolierte, Blutlymphozyten zu einer sehr starken Proliferation anregen ließen. Die antwortenden Zellen in autologen bzw. allogenen MLR's sind stets T-Lymphozyten (LOHRMANN und WHANG-PENG, 1974; OPELZ et al., 1975; KUNTZ et al., 1976).
Auf ihre zytotoxische Wirkung wurden die Lymphozyten T. annulata-infizierter Rinder von PRESTON et al. (1983) untersucht. Während der Infektion konnten die Autoren nur wenige zytotoxische Zellen nachweisen. Tiere hingegen, die sich spontan oder aufgrund einer Chemotherapie von der Erkrankung erholt hatten, besaßen PBL und Lymphknotenzellen, die T. annulata-infizierte und transformierte Lymphoblastoidzellen in vitro lysieren konnten.

Weitaus detailliertere Kenntnisse als bei T. annulata-infizierten Rindern liegen bis heute über die Immunabwehr gegen T. parva, dem Erreger des Ostküstenfiebers der Rinder, vor. Auch bei T. parva konnten Rinder weder durch eine Applikation von Immunsera (MUHAMMED et al., 1975) noch nach Verabreichung von Kolostrum (BURRIDGE und KIMBER, 1973) passiv immunisiert werden. Nach einer Übertragung von Zellen aus dem Ductus thoracicus eines Zwillingskalbes, das eine T. parva-Infektion überstanden hatte, auf das nicht befallene Geschwistertier, konnte in dem Empfängertier kein wirksamer Infektionsschutz entwickelt werden (EMERY und McCULLAGH, 1980).

In vitro wurde die zellabhängige Immunität gegen T. parva von zahlreichen Autoren demonstriert (PEARSON et al., 1979a; EUGUI und EMERY, 1981; EMERY et al., 1981; PRESTON, 1981; PEARSON et al., 1982). Über einen zytotoxischen Effekt peripherer Blutlymphozyten bei T. parva-immunen Tieren hatten PEARSON et al. (1982) berichtet. Sie differenzierten zwischen spezifischen

und unspezifischen zytotoxischen Zellen. Die Wirkung der spezifischen zytotoxischen Zellen sei nur auf autologe, das gleiche Histokompatibilitätsantigen besitzende Zielzellen gerichtet (EMERY et al., 1981; EUGUI und EMERY, 1981). Allogene Zielzellen hingegen würden nur von unspezifischen zytotoxischen Zellen, den natürlichen Killerzellen, vernichtet (PEARSON et al., 1982).

PRESTON et al. (1983) verglichen die Zytotoxizitätsreaktionen peripherer Blutlymphozyten T. annulata-immuner Tiere mit denen T. parva-immuner Rinder und vermuteten ähnliche Funktionsmechanismen. Sie identifizierten bestimmte Histokompatibilitätsantigene der Zellen T. annulata-immuner Rinder und wiesen dadurch histokompatible Gemeinsamkeiten zwischen den zytotoxischen Zellen und ihren autologen Zielzellen bzw. nicht übereinstimmende Histokompatibilitätsantigene unter den allogenen Zellen nach. Die Autoren warnten allerdings davor, die Lysis allogener Zielzellen ausschließlich histokompatibilitätsunspezifischen Killerzellen zuzuschreiben, da breit gefächerte Kreuzreaktionen eventuell ein Erkennen eines fremden Histokompatibilitätsantigens als eigenes ermöglichten.

2.3. Differenzierung und Charakterisierung der Lymphozyten

2.3.1. Ontogenese der Lymphozyten

Die Vorläuferzellen aller Lymphozyten, die Stammzellen, werden in den haematopoetischen Organen gebildet. Beim Foetus ist die Stammzellproduktion zunächst im Dottersack, später in der Leber und schließlich auch in der Milz und im Knochenmark zu beobachten. Im adulten Organismus liegt die Hauptquelle für die Stammzellbildung im Knochenmark (OWEN, 1972).
Über die Blutbahn gelangen einige dieser Zellen zum Thymus, in dem sie sich zu T-Zellen weiterentwickeln. Andere, aus den

blutbildenden Geweben stammende Zellen, wandern bei Vögeln in die Bursa fabricii, einem lymphoretikulären Organ unmittelbar dorsal der Kloake, bzw. bei Säugern zum Bursaäquivalent, wo sich die Zellen zu B-Lymphozyten differenzieren. Nach COOPER et al. (1968) und SELL et al. (1980) werden die Bursafunktionen bei Säugetieren von darmassoziierten Lymphoidgeweben, wie den Peyerschen Platten, übernommen, während GOWANS (1975) dem Knochenmark die Bursaaufgabe zuschrieb. Im Thymus wird durch Thymushormone, wie Thymosin, Thymopoietin und noch nicht genau bestimmte Substanzen mit einem niedrigen Molekulargewicht die weitere Zellreifung angeregt (BACH, 1973, 1976; IKEHARA et al., 1975; LEINO et al., 1977; DARDENNE et al., 1978), in der die T-Zellen charakteristische Veränderungen erfahren. Die T-Zellen verlassen den Thymus über die Blutbahn bereits als immunologisch kompetente T-Lymphozyten. Sie siedeln sich in bestimmten Regionen der peripheren lymphatischen Organe an, z.B. in der parakortikalen Zone der Lymphknoten und in den Gebieten um die Milzarteriolen, oder verbleiben weiterhin in Zirkulation (TIZARD, 1981).

Bereits vor dem Antigenkontakt differenzieren sich die Lymphozyten zu Vorläuferzellen unterschiedlicher funktioneller Subpopulationen. Kommen die Zellen mit einem bestimmten Antigen in Kontakt, beginnen sie sich vermehrt zu teilen und differenzieren sich zu Effektor-, Gedächtnis- und Regulatorzellen (KELLER, 1977).
Die relativ kurzlebigen Effektorzellen sind z.B. für die Transplantatabstoßung, aber auch für die zellvermittelte Zytotoxizitätsreaktion und die allergische Reaktion vom verzögerten Typ verantwortlich. Aufgrund der länger lebenden Gedächtniszellen kommt es bei einem erneuten Kontakt mit demselben Antigen zu einer schnelleren und intensiveren Immunabwehr. Zu den Regulator-T-Zellen gehören T-Helfer- und T-Suppressorzellen, die jeweils fördernd bzw. hemmend auf die Immunantwort mit B- und T-Zellen wirken.

T-Lymphozyten, die durch Kontakt mit einer antigenen Determinante stimuliert worden sind, setzen lösliche Mediatorstoffe, sogenannte Lymphokine, frei.
Die B-Zellvorläufer beginnen bereits während ihrer Differenzierung, Immunglobulinmoleküle (IgM) zu synthetisieren, die sich zunächst noch im Zytoplasma befinden (KELLER, 1977). Die IgM-tragenden B-Lymphozyten wandern schließlich in andere Organe. Besonders gut scheinen sich die Lymphozyten in der Milz differenzieren zu können, wo sie auch ohne Antigenstimulation proliferieren und die Fähigkeit erlangen können, außer IgM auch IgD zu produzieren und dieses als Antigenrezeptor (SIg) in die Zellmembran einzubauen (KELLER, 1977). Nach einer Antigenstimulation differenzieren sich die B-Zellen dann zu Plasma- und Gedächtniszellen. Die Plasmazellen synthetisieren identische Immunglobulinmoleküle, deren Spezifität mit der der Oberflächenmembranrezeptoren übereinstimmt. Die Gedächtniszellen verursachen bei jedem neuen Kontakt mit demselben Antigen eine schnellere und stärkere Produktion spezifischer Immunglobuline als bei der ersten Antigenauseinandersetzung (KELLER, 1977).

2.3.2. Charakterisierung der Lymphozyten anhand ihrer Oberflächenmembranrezeptoren

Lymphozyten verschiedener Tierarten besitzen unterschiedliche, für die jeweilige Zellpopulation charakteristische Oberflächenmembranrezeptoren.
Beispielsweise können Lymphozyten heterologe, d.h. von einer fremden Tierart stammende, Erythrozyten binden. Hierbei heften sich die roten Blutkörperchen in Form einer Rosette an die aus einem Glykopeptid bestehenden (BOLDT und ARMSTRONG, 1976) Rezeptoren der Lymphozytenmembran an. Bei bovinen Lymphozyten werden meistens Schaferythrozyten (SRBC) verwendet, da man mit ihnen im Vergleich zu roten Blutkörperchen anderer Tiere die stabilsten Rosetten und den höchsten Prozentsatz rosettenbildender Lymphozyten erhält.

Die Bildung der ersten Spontan- oder E-Rosetten mit Rinderlymphozyten gelang GREWAL et al. (1976), nachdem sie foetales Kälberserum (FCS) dem Nährmedium zugefügt hatten und die Schaferythrozyten mit Neuraminidase behandelt hatten. Die Autoren bezeichneten die E-Rosettenbildung als typisches Differenzierungsmerkmal für bovine T-Zellen. FRUCHTMANN et al. (1977) sowie BUSCHMANN und PAWLAS (1980) verglichen die Fähigkeit unbehandelter und mit Neuraminidase behandelter Schaferythrozyten, sich an Lymphozyten anzulagern. Dabei stellten sie einen wesentlich höheren Prozentsatz E-Rosetten-bildender Lymphozyten nach der Neuraminidaseanwendung fest. Eine deutliche Verbesserung der Rosettenbildung wurde durch Verwendung von Dextran im Nährmedium erzielt (WARDLEY, 1977; BINNS, 1978; GREWAL und BABIUK, 1978). Außerdem konnten GREWAL und BABIUK (1978) die E-Rosettentechnik verbessern, indem sie die SRBC statt mit Neuraminidase mit 2-Aminoethylisothiuroniumbromid (AET) präparierten.

Auf der Oberfläche von B-Lymphozyten befinden sich Rezeptoren für Komplementkomponenten. Die Rezeptoren, die wahrscheinlich aus einem Glykoprotein zusammengesetzt sind (FEARON, 1979, 1980), können mit der EAC-Rosettenmethode kenntlich gemacht werden. Hierfür müssen die heterologen Erythrozyten mit einem IgM-Antikörper gegen SRBC, und mit Mäusekomplement beladen werden (SHANNON und HASTINGS, 1977; HIGGINS und STACK, 1978), um sich an die Komplementrezeptoren anlagern zu können. Die Komplementrezeptoren reagieren vorwiegend mit der Komplementkomponente C3.
Zahlreiche Zellen sind mit einer weiteren, aus einem Glykoprotein bestehenden (TAKACS, 1980) Oberflächenrezeptorenart ausgestattet, die Immunglobulin G (IgG) binden kann. Zu diesen gehören B-(BASTEN et al., 1972), T -Lymphozyten (BOXEL und ROSENSTREICH, 1974; AHMED et al., 1981) und Makrophagen (BERKEN und BENACERRAF, 1966; AREND und MANNIK, 1973). Die Immunglobuline lagern sich mit ihrem Fc-Teil an die Rezeptoren. Diese werden entsprechend ihrer Funktion als Fc-Rezeptoren bezeichnet (DICKLER, 1976) und können mit der EA-Rosettenme-

thode nachgewiesen werden, bei der sich mit IgG-Antikörpern beladene Schaferythrozyten rosettenförmig an die Fc-Rezeptorenträger anlagern.

Ferner können B-Lymphozyten anhand ihrer Oberflächenimmunglobuline (SIECKMANN, 1980) und T-Zellen aufgrund ihrer Theta-Antigene mit Hilfe eines Immunfluoreszenztestes charakterisiert werden.

Aus dem Blut isolierte Lymphozyten besitzen bestimmte Zucker, wie N-Acetyl-D-Glukosamin, N-Acetyl-D-Galactosamin und D-Mannose, in den Glykoproteinen ihrer Oberflächenmembranen. Diese Zuckermoleküle dienen als Rezeptoren für bestimmte Lektine, sogenannte Mitogene (HENKART und FISHER, 1975; SHARON, 1976). Die einzelnen mitogenen Substanzen können sich jeweils an die Rezeptoren bestimmter Lymphozytenpopulationen anheften und diese Zellen zur Blastentransformation und Proliferation anregen. Die ersten Erfahrungen wurden mit Phytohämagglutinin (PHA) gemacht, einem Extrakt aus Phaseolus vulgaris (NOWELL, 1960). Von Mäuselymphozyten ließen sich ausschließlich die T-Zellen durch PHA anregen. Concanavalin A (Con A), aus Canavalia ensiformis, zeigte die gleiche Zellspezifität (JANOSSY und GREAVES, 1971). B- und T-Zellen gemeinsam werden von Pokeweed-Mitogen, aus Phytolacca americana stimuliert.
Bei Rinderlymphozyten erreichten MUSCOPLAT et al. (1974) nach PHA- und PWM-Anwendungen bei den gleichen Zellpopulationen wie im Mäusemodell hohe Proliferationsraten. Ebenfalls mit Erfolg testeten LAZARY et al. (1974) PHA- und Con A-Stimulationen bei bovinen Lymphozyten. Auch PEARSON et al. (1979b), die elf verschiedene Lektine hinsichtlich ihres stimulierenden Einflusses auf Rinderzellen untersucht hatten, bestätigten die Wirkung der genannten Mitogene. Zusätzlich erwies sich das Lektin Peanutagglutinin, das Mäuselymphozyten gegenüber keinen mitogenen Effekt gezeigt hatte, in PEARSON's et al. (1979b) Untersuchungen als guter Rinder-T-Zellen-Stimulator.

2.3.3. Das Major Histocompatibility System (MHS) und seine Rolle in der Mixed Lymphocyte Reaction (MLR)

Lymphozyten lassen sich nicht nur aufgrund ihrer Membranrezeptoren für E-, EA- und EAC-Rosetten, ihrer Oberflächenimmunglobuline, ihrer Theta-Antigene und ihrer unterschiedlichen Stimulierbarkeit durch Mitogene, sondern auch durch weitere antigene Eigenschaften charakterisieren.
Auf den Oberflächen aller von einem Säugetier abstammenden Zellen befinden sich antigene Determinanten, die von Zellen fremder Individuen erkannt werden. Diese Epitope bestehen aus auf der Zelloberfläche sitzenden Glykoproteinen. Die Information für die Synthese dieser Determinanten ist in einer bestimmten genetischen Region verankert, die als Major Histocompatibility Complex (MHC) oder System (MHS) bezeichnet wird. Es wird allgemein angenommen, daß die Zellen aller Säugetiere MH-Systeme besitzen.

Die genauesten Kenntnisse liegen bis heute über das MHS der Maus vor. Es wird H-2-Gen-Komplex genannt und liegt auf dem 17. Chromosom. Der H-2-Gen-Komplex wird in fünf Regionen unterteilt, die aus vielen Genen zusammengesetzt sind, deren unterschiedliche Kombinationen die Prägung zahlreicher antigener Strukturen zulassen. Dem Zentromer am nächsten liegt die K-Region, der die I-, S-, G- und D-Region folgen (KLEIN, 1975; SHREFFLER und DAVID, 1975; KATZ, 1977). Die K- und D-Regionen enthalten Gene mit der Information zur Ausbildung serologisch identifizierbarer Antigene, die auf der Oberfläche nahezu aller Mäusezellen gefunden wurden und bei einer Transplantatabstoßung eine wichtige Rolle spielen (KATZ, 1977).
Die auf der S-Region liegenden Gene enthalten die Information für die Ausbildung der vierten Komponente des Komplementsystems (CURMAN et al., 1975; LACHMANN et al., 1975).
Die G-Region enthält Gene für die Ausbildung antigener Determinanten auf Erythrozyten.
Die I-Region besteht aus fünf Unterregionen. Fängt man am Zentromerende mit der Aufzählung an, liegen die Subregionen in

folgender Reihenfolge auf dem Chromosom: I-A, I-B, I-J, I-E und I-C. Die I-J-Subregion ist für die Kontrolle der Suppressor-T-Zellfunktionen zuständig. Die I-A-, I-B- und I-C-Subregionen beinhalten Gene, die die Immunantwort auf bestimmte synthetische Antigene, Proteine und zelluläre Antigene kontrollieren. Deshalb werden diese Gene als Ir-(Immune response-) Gene bezeichnet. Gene aus denselben Subregionen rufen die Ausbildung antigener Determinanten, der sogenannten Ia-(Immune region associated-)Antigene, auf der Zelloberfläche hervor. Lymphozyten, die unterschiedliche Ia-Antigene tragen, können sich in vitro gegenseitig zur Mitosesteigerung und Transformation anregen (Mixed Lymphocyte Reaction). Erkennt eine Zelle ein fremdes Ia-Antigen auf der Membran eines lebenden, allogenen Lymphozyten, beginnt sie, sich zu transformieren und sich verstärkt zu teilen. Die deutlichsten Stimulationen werden erreicht, wenn die aufeinander wirkenden Zellpopulationen verschiedene auf der Ia-Subregion codierte Antigene besitzen. Auch Unterschiede der K- und/oder D-Region-abhängigen Antigene können schwache Proliferationen hervorrufen (KATZ, 1977).

Der menschliche MHC, HLA (Human Lymphocyte Antigens), besteht aus drei genetischen Regionen, HLA-A, -B und -C. Entsprechend der I-Regiongene der Maus verursachen beim Menschen die Gene eines vierten, nicht im Bereich des HLA-Komplexes gelegenen Abschnittes, der D-Region, die Ausbildung der für die Lymphozytenproliferation der MLR verantwortlichen antigenen Determinanten (KATZ, 1977).

Über Lymphozytenantigene beim Rind haben SCHMID und OTTO (1970) sowie SCHMID und CWIK (1972) berichtet. Daß Rinderlymphozyten auch Histokompatibilitätsantigene besitzen, wurde erstmalig von USINGER et al. (1977) und später von SPOONER et al. (1978, 1979) und von CICHON (1979) beschrieben. Sie nannten den Major Histocompatibility Complex der Rinder BLA (Bovine Lymphocyte Antigens; SPOONER et al., 1978), bzw. BoLA

(SPOONER et al., 1979; CICHON, 1979), und den ihm zugeordneten Chromosomenabschnitt entsprechend BLA- bzw. BoLA-Region.

Um in der MLR die stimulierenden und die antwortenden Zellen getrennt betrachten zu können, hemmt man die Mitose einer der beiden Zellgruppen durch Bestrahlung oder Mitomycin C-Zugabe. Dadurch können die behandelten Zellen nicht mehr als antwortende Zellen (Responder) reagieren, sondern nur noch die allogenen Lymphozyten zur Proliferation anregen.

Seit langem wird die Frage, welche Zellpopulationen als Stimulatoren wirken können, heftig diskutiert. MACLAURIN (1972) erklärte, daß T-Zellen die induzierende Rolle übernehmen. PLATE und McKENZIE (1973) schreiben dagegen den B-Lymphozyten die stimulierende Aufgabe zu. Nach CHEERS und SPRENT (1973) sind T- und B-Zellen an der Stimulation beteiligt. McDEVITT et al. (1974) inkubierten Lymphozyten, die sich in der I- und S-Region unterschieden. Bei diesen Versuchen stimulierten T- und B-Zellen gleichermaßen.
Als dieselben Autoren Zellen miteinander kombinierten, die sich in den I-A- und I-B-Subregionen unterschieden, waren B-Zellen die stärkeren Stimulatoren. In einer MLR zweier Populationen, die unterschiedliche I-B- und S-Regionen besaßen, stimulierten T-Zellen.
Ob jeweils die T- oder B-Zellen die stimulierende Funktion übernehmen, scheint also letztendlich von den genetischen Unterschieden der aufeinander wirkenden Zellpopulationen abhängig zu sein.

Bei den bisher beschriebenen MLR's handelte es sich stets um Reaktionen zweier allogener Zellpopulationen. Denn nur die Zellen verschiedener Individuen besitzen Unterschiede im Histokompatibilitätssystem und können sich dadurch gegenseitig stimulieren.
Das Phänomen, daß eine Lymphozytengruppe eine weitere zur Proliferation anregt, wurde allerdings auch bei verschiedenen Zellen eines Individuums beobachtet. Hier geben nicht die

H-2-Ia-Antigene, die Produkte der H-2-K- und/oder H-2-D-Region bzw. die D-Region-abhängigen Determinanten menschlicher Zellen das induzierende Signal, sondern andere antigene Determinanten der Zelloberflächen müssen für die Einleitung der verstärkten Zellteilung verantwortlich sein. 1969 erreichten FRIDMAN und KOURILSKY mit neoplastischen Zellen von sechs an einer akuten lymphatischen und von einem an einer myeloischen Leukose erkrankten Menschen, eine deutliche Stimulation der jeweiligen autologen Lymphozyten. Analog zur allogenen MLR vermuteten die Autoren, daß die Proliferation durch den antigenen Unterschied zwischen den Tumorzellen und den normalen Lymphozyten hervorgerufen worden war.
Auch mit Mitogenen aktivierte Zellen konnten eine Proliferation autologer Lymphozyten bewirken (WEKSLER, 1973).
In den beschriebenen Beispielen der autologen MLR ist es denkbar, daß die durch die D-Region kontrollierten Determinanten der Zelloberflächen sich im Laufe der Transformation verändert hatten und dadurch autologe Lymphozyten anregen konnten.

Als antwortende Zellen reagieren T-Lymphozyten sowohl in der allogenen MLR (LOHRMANN und WHANG-PENG, 1974) als auch in der autologen (OPELZ et al., 1975; KUNTZ et al., 1976) mit einer starken Proliferation. Die auto- und alloreaktiven Lymphozyten der Menschen scheinen offensichtlich aus zwei verschiedenen T-Zell-Subpopulationen zu bestehen. Die autoreaktiven Zellen sind mittelgroße Lymphozyten mit einer geringen Dichte. Sie lassen sich gut durch Con A aktivieren (FOURNIER und CHARRIERE, 1978; SAKANE und GREEN, 1979).
T-Zellen, die auf eine allogene Stimulation antworten, setzen sich aus Zellfraktionen mit hoher und niedriger Dichte zusammen und reagieren auf eine PHA-Stimulation mit einer deutlichen Proliferation.
Ein weiteres Charakteristikum zur Unterscheidung der beiden Zelltypen ist ihre Affinität zu heterologen und zu autologen Erythrozyten. Die autoreaktiven Zellen können sich viel besser

als die alloreaktiven an Schaferythrozyten bzw. an autologe Erythrozyten anlagern (TOMONARI et al., 1980).
Auf einen zweiten antigenen Reiz durch wiederholtes Zufügen von Stimulatorzellen, reagieren die Responder mit einer deutlich stärkeren und früher einsetzenden Proliferation als bei der ersten MLR (WEKSLER et al., 1981). Das beweist, daß sich die beiden klassischen Charakteristika einer zellulären Immunabwehr, Gedächtnis und Spezifität, in vitro durch die MLR demonstrieren lassen.

2.4. Kultivierung und Charakterisierung Theilerien-Schizonten-befallener Zellen

Erste Ansätze, T. annulata-infizierte Zellen in vitro zu züchten, wurden von TCHERNOMORETZ (1945) durchgeführt. Ihm gelang es, aus Milz- und Lymphknotengeweben infizierter Rinder Schizonten enthaltende Zellen zu gewinnen und in Tyrode's Nährlösung mit Kälberserum 12 Tage lang am Leben zu erhalten. Erst unter Zusatz von Glutamin, Pyridoxin, Inositol und Riboflavin waren die Schizonten und ihre Wirtszellen in der Lage, sich zu teilen. BROCKLESBY und HAWKING (1958) verbesserten die Kultivierungsmethoden dahingehend, daß T. annulata in Zellkulturen nicht nur sich vermehren, sondern sogar 59 Tage lang überleben konnten. Es gelang ihnen noch nach 42 Tagen, mit den T. annulata-befallenen Kulturzellen Rinder zu infizieren. Eine noch längere Kultivierungszeit von drei Monaten erreichten TSUR und ADLER (1962), als sie erstmalig die infizierten Zellen in Kulturflaschen als einschichtigen Rasen (Monolayer) wachsen ließen. Durch die Verwendung von Nierenzellen neugeborener Hamster als Nährzellen im Medium konnte HULLIGER (1965) die Zellkulturen ebenfalls über mehrere Monate am Leben erhalten. Sie beobachtete, daß bei ihren Kulturen die Wirtszellmitoserate mit der Anzahl der Theilerienteilungen übereinstimmte, und sowohl der Prozentsatz infizierter Zellen als

auch die Schizontenpartikelzahl pro Zelle annähernd konstant blieben.
Mit Hilfe neuer standardisierter Nährmedien können Theilerien-infizierte Lymphozyten heute beliebig lange in vitro gehalten und vermehrt werden.
Eine Methode, in vitro Lymphozyten mit Theilerien (T. parva) zu infizieren, beschrieben erstmalig BROWN et al. (1973). Sie verwendeten Sporozoite aus den Speicheldrüsen infizierter Rhipicephalus appendiculatus-Zecken, die sie gemeinsam mit den Lymphozyten inkubierten. Nach einigen Tagen hatte sich eine große Anzahl Zellen zu Schizonten-tragenden Lymphoblastoid-zellen transformiert. Zu gleichen Ergebnissen kamen SPOONER und BROWN (1980) mit T. annulata.
Aufgrund dieser Untersuchungen ist es nunmehr möglich, Lymphozyten in vitro zu infizieren und diese im Vergleich zu normalen Lymphozyten desselben Wirtstieres zu untersuchen. So konnte die Mitogenstimulierbarkeit T. annulata-befallener Kulturzellen mit der normaler peripherer Blutlymphozyten (PBL) desselben Rindes verglichen werden (FRESE, 1983). Hierbei zeigte sich, daß die Mitose der schizontenhaltigen Lymphoblasten durch die intrazellulären Parasiten bereits so stark angeregt worden war, daß sie durch die unspezifischen Lektine nicht mehr oder nur minimal gesteigert werden konnte.

Um die Antigenstrukturen normaler peripherer Rinderblutlymphozyten bzw. T. parva-infizierter Lymphoblastoidzellen zu erfassen und die mit der Antigenität im Zusammenhang stehenden Eigenschaften der Zellen herauszufinden, führten PEARSON et al. (1979 a) autologe und allogene Mixed Lymphocyte Reaction's (MLR) durch. Sie inkubierten normale PBL verschiedener Rinder miteinander und stellten fest, daß sich die Zellen gegenseitig aufgrund unterschiedlicher Histokompatbilitätsantigene stimulierten, während die autologe MLR normaler PBL negativ verlief. Eine noch deutlichere Proliferation wurde unter Verwendung T. parva-infizierter Lymphozyten als Stimulatoren erreicht. Sowohl allogene als auch autologe PBL ließen sich durch die befallenen Kulturzellen zur Transformation und zur

verstärkten Teilung anregen. In weiteren Versuchen wurde der Nachweis erbracht, daß weder Zellkulturüberstände noch freie Schizonten, sondern nur die lebenden infizierten Zellen stimulierend auf die inkubierten Lymphozyten wirkten. Die Autoren folgerten daraus, daß die infizierten Kulturzellen ein parasitenbedingtes Antigen auf ihrer Oberfläche besitzen müssen, durch das sich die Responder stimulieren lassen.
Nach Behandlung der infizierten Zellen mit Parvaquone wurden die Schizonten weitgehend eliminiert. Danach verloren die Kulturzellen ihre Fähigkeit, autologe Zellen zu stimulieren (PEARSON et al., 1979a).
Die Ergebnisse von PEARSON et al. (1979 a) wurden von FRESE (1983) auch bei T. annulata bestätigt. Er kam zu dem Schluß, daß bei der T. annulata-Infektion eine Stimulation der PBL an das Vorhandensein lebender Parasiten-befallener Zellen gebunden ist.
Selbst bei Babesia equi, einer Piroplasmenart des Pferdes, die aufgrund ihrer Entwicklung den Theilerien zugeordnet werden sollte, konnten ZWEYGARTH et al. (1983) mit infizierten Lymphoblastoidzellen sowohl allogene als auch autologe PBL stimulieren. Sie vermuteten, daß die auf der Oberfläche parasitenbefallener Zellen erscheinenden Antigene mit den auf der D-Region codierten Determinanten des Menschen vergleichbar sind. PEARSON's et al. (1979 a) Aussagen widersprechend müßten diese Oberfächenantigene auch nach einer Eliminierung der Schizonten aus der Wirtszelle weiterhin zur Stimulation peripherer Blutlymphozyten in der Lage sein (ZWEYGARTH et al., 1983).

2.5. Chemotherapie

Zahlreiche Chemotherapeutika verschiedener Wirkstoffgruppen, wie Antibiotika, Malarizide und Kokzidiostatika, wurden auf ihre theilerizide Wirkung hin erprobt.

Unter den Antibiotika konzentrierten sich die Untersuchungen schon recht früh auf die Gruppe der Tetrazykline. So schien Chlortetrazyklin eine deutliche Wirkung auf die Schizontenstadien auszuüben, während die erythrozytären Parasitenformen unbeeinflußt blieben. Durch wiederholte intravenöse Verabreichungen des Chlortetrazyklins innerhalb der Präpatenzzeit einer T. parva-Infektion wurde die Schizontenvermehrung deutlich gehemmt. Injizierte man den Wirkstoff erst, nachdem die Wirtstiere bereits schwache Symptome gezeigt hatten, erholten sich die Rinder unter Ausbildung einer soliden Immunität (NEITZ, 1953).

Neben Chlortetrazyklin applizierte RADKEVICH (1960) an drei aufeinander folgenden Tagen auch Oxytetrazyklin und verschiedene andere Wirkstoffe, wie Aminoacriquin, Diminazen, Haemosporidin, Sulphantrol und Trypoflavin T. annulata-infizierten Tieren. Er erzielte mit den einzelnen Substanzen eine Heilungsquote von durchschnittlich 50%. Durch Kombination der erwähnten Mittel konnte er den Prozentsatz der geheilten Tiere auf über 75% anheben. Eine zusätzliche symptomatische Therapie erhöhte den Anteil der geheilten Rinder auf über 90% (RADKEVICH, 1961, 1966).

Ebenfalls einen therapeutischen Effekt erzielten BROWN et al. (1977 a) mit Tetrazyklinen bei experimentell mit T. parva infizierten Rindern. Die Tiere waren vom Zeitpunkt des ersten parasitologisch positiven Befundes an fünf Tage lang mit Oxytetrazyklin behandelt worden und hatten sich ausnahmslos erholt. Zehn weiteren an Ostküstenfieber erkrankten Tieren wurde nach dem gleichen Schema N-Pyrrolidinomethyltetrazyklin appliziert. Nachdem neun dieser Rinder überlebt hatten, untersuchten BROWN et al. (1977 b), ob mit Hilfe des N-Pyrrolidinomethyltetrazyklin auch eine wirksame Immunprophylaxe durchführbar wäre. Experimentell mit T. parva-infizierten Rindern wurden, am Inokulationstage beginnend, vier N-Pyrrolidinomethyltetrazyklininjektionen im täglichen Abstand verabreicht. Bei allen auf diese Weise infizierten und behandelten Tieren konnten die Autoren durch Reinfektionsversuche mit dem homologen T. parva-Stabilat eine Immunität nachweisen.

Über erste Therapieversuche mit einem Vertreter der Antimalariamittel bei T. parva- und T. annulata-infizierten Rindern berichtete NEITZ (1950, 1951). Dieses Malarizid, Pamaquin, wirkte spezifisch auf die erythrozytäre Parasitenform der Theilerien (NEITZ, 1950, 1951). Mit anderen Malariziden, wie Primaquin und Mepacrin, konnten T. annulata-Infektionen unter zusätzlicher symptomatischer Behandlung geheilt werden (PEREPONOV und NECHAEV, 1963).
Eine erfolgreiche Therapie von T. parva-Infektionen führten McHARDY et al. (1976) mit dem malarizid wirkenden Menocton durch. Da Menocton allerdings sehr teuer ist, wurde es durch ein preiswerteres Naphtoquinonderivat, dem Parvaquone, ersetzt. Parvaquone besitzt gegen T. parva eine ebenso hohe Effektivität wie Menocton (MORGAN und McHARDY, 1982). Gegen T. annulata wurde Parvaquone vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion eingesetzt. Hierbei stellte sich heraus, daß die prophylaktische Verabreichung des Chemotherapeutikums am wirkungsvollsten ist (GILL et al., 1981).
Als synthetisches Derivat eines weiteren Malarizids, dem Alkaloid Febrifugin, wurde Halofuginon erfolgreich zur Therapie experimentell T. annulata- bzw. T. parva-infizierter Rinder eingesetzt (SCHEIN und VOIGT, 1979).

Die Ergebnisse der Tierversuche ließen noch keine konkreten Rückschlüsse auf den Wirkungsmechanismus der einzelnen Chemotherapeutika zu. Erst im Rahmen von in vitro-Tests konnte die direkte Wirkung der theileriziden Substanzen eindeutig nachgewiesen werden.
Nach der Zugabe von 0,1 mg/l Parvaquone zu T. parva-befallenen Kulturzellen wurde eine deutliche Abnahme des Anteils der Schizonten-befallenen Zellen (Schizontenindex) registriert (McHARDY, 1979). Zusätzlich beobachtete McHARDY (1979) eine Reduktion der Anzahl der parasitären Chromatinpartikel im Wirtszytoplasma. Diese Ergebnisse konnte KOHLMEYER (1983) anhand T. annulata-infizierter Kulturzellen weitgehend bestätigen. Auch nach der Halofuginon-Behandlung Theilerien-befallener Kulturzellen konnte eine erhebliche Reduktion des Schi-

zontenindex nachgewiesen werden (MORGAN und McHARDY, 1982; KOHLMEYER, 1983).
Ein weiteres Versuchspräparat, das Kokzidiostatikum Bay g 7183, dessen chemotherapeutischer Einfluß auf Eimerien bei Hühnern (AICHINGER et al., 1978) und bei Mäusen, Ratten, Kaninchen und Schafen (HABERKORN und SCHULZ, 1981) nachgewiesen worden war, wurde von KOHLMEYER (1983) an T. annulata-infizierten Kulturzellen geprüft. Sie vermutete, daß Bay g 7183 schizontostatisch wirkt.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

Für die Gewinnung peripherer Blutlymphozyten (PBL) wurden acht Bullenkälber der Rasse "Deutsche Schwarzbunte" im Alter von drei bis acht Monaten herangezogen.
Die Tiere wurden unter konventionellen Bedingungen teils in Einzelboxen auf Stroheinstreu, teils auf der Koppel gehalten, mit pelletiertem Kälberaufzuchtfutter (Fa. Ströh, Lübeck) gefüttert und erhielten Heu und Wasser ad libitum. Die Kälber waren klinisch gesund.
Den Rindern wurde Blut aus der Vena jugularis entnommen und unter Zusatz von 10 IE Liquemin 25 000^R pro ml Blut (Fa. Hoffmann La Roche, Grenzach-Wyhlen) mit physiologischer NaCl-Lösung im Verhältnis 1:1 gemischt. In einem Zentrifugenglas wurden vorsichtig 5 ml des verdünnten Blutes auf 3 ml Ficoll-Paque^R (Fa. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden; Dichte: 1,077 g/ml) geschichtet und mit 400 x g 35 - 40 Minuten bei 20°C zentrifugiert. Mit einer PASTEUR-Pipette wurden Lymphozyten und Thrombozyten aus der Interphase abgesogen, während Granulozyten und Erythrozyten aufgrund ihres größeren spezifischen Gewichtes im Sediment zurückblieben. Zur Entfernung der Thrombozyten und des Ficoll-Paques^R wurden die Lymphozyten 3 x mit RPMI 1640 Medium (Fa. Biochrom, Berlin) mit 150 x g 10 Minuten lang bei 4°C gewaschen und in Kulturmedium resuspendiert.

Für die Infektion der PBL mit Theileria annulata wurde der Stamm Ankara 1972 verwendet. Die Sporozoite wurden nach der Methode von SCHEIN (1976) aus den Speicheldrüsen befallener Hyalomma anatolicum excavatum-Zecken gewonnen und mit den Lymphozyten in einem Reagenzröhrchem für ca. 10 Tage bei 37°C in RPMI 1640 Medium inkubiert (SPOONER und BROWN, 1980). Das

Medium enthielt 10% hitzeinaktiviertes Kälberserum, 1% L-Glutamin, 100 IE/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 0,05% Amphotericin (Fa. Biochrom, Berlin). Anschließend wurden die Zellen in 50 ml-Falcon-Kulturfläschchen (Fa. Greiner, Nürtingen) kultiviert und ca. 50 x passagiert und vermehrt. Das Medium wurde alle drei bis vier Tage gewechselt. Die Kultivierung erfolgte in einem CO_2-Brutschrank (Heraeus Elektronik, Fa. Heraeus Christ, Osterode) bei 37°C und 96% Luftfeuchtigkeit mit 5% CO_2. Die Kulturlymphozyten wurden nach etwa sechswöchiger Passagierung und Vermehrung zu 7,5% mit Dimethylsulfoxid (DMSO; Fa. Merck-Schuchardt) versehen, in 1 ml fassende Glasampullen gefüllt, in einem Gefrierautomat (Mic 15 Microprocessor controlled freezing System; Fa. Cryoson Midden Beemster), auf -120°C heruntergekühlt und schließlich in flüssigem Stickstoff bei -196°C aufbewahrt.
Die eingefrorenen Kulturzellen wurden bei Bedarf in einem 37°C Wasserbad aufgetaut, zweimal mit RPMI-Medium gewaschen, um das DMSO aus der Zellsuspension zu entfernen, und erneut in Falcon-Kulturfläschchen passagiert. Bereits ab dem 2. bis 3. Tag bildeten die Zellen am Boden der Falcon-Flasche einen Zellrasen.

Die Gewinnung der kultivierten Theileria annulata-befallenen Lymphoblasten für die Versuche konnte jeweils drei bis vier Tage nach dem letzten Mediumwechsel aus einem Kulturfläschchen mit dicht gewachsenem Zellrasen erfolgen. Hierfür wurde der Überstand aus einer Falcon-Flasche in ein Zentrifugenröhrchen abgegossen und anschließend der Flaschenboden mit Hilfe einer PASTEUR-Pipette mit RPMI-Medium kräftig nachgespült, um am Boden adhärierende Zellen noch zu lösen und ebenfalls in das Röhrchen zu füllen. Die so gewonnenen Kulturzellen wurden für zehn Minuten bei 4°C und 150 x g zentrifugiert. Das Zellsediment wurde nach Verwerfen des Überstandes in einem Milliliter des beschriebenen Nährmediums resuspendiert. Durch Verdünnung mit dem Nährmedium wurde die Zellsuspension auf die gewünschte Konzentration eingestellt und bis zur Fortsetzung der Versuche bei 4°C aufbewahrt.

Zur Zellzählung wurden 10 µl der Zellsuspension in 1 ml TÜRK'-scher Lösung (Fa. Merck, Darmstadt) gegeben und gut geschüttelt. Mit Hilfe der NEUBAUER-Zählkammer wurde die Zellzahl ermittelt.

Für die Therapie in vitro wurden folgende Substanzen verwendet:

1. Bay g 7183 (B)
   1-[3,5-dichlor-4-(4'-trifluormethylsulfonyl-phenoxy)-phenyl] 3-methyl-1,3,5-triazin-2,4,6-(1H,3H,5H)trion
   (AICHINGER et al., 1978)
   Hersteller: Fa. Bayer, Leverkusen
2. Halofuginon (Stenorol^{R})
   di-trans-7-bromo-6-chloro-3-[3-(3-hydroxy-2-piperidyl)acetonyl]-4-(3H)-chinazolinon-aceturat(HA),
   -hydrobromid (HB),
   -lactat (HL)
   (Produktinformation Hoechst AG)
   Hersteller: Roussel Uclaf, Paris;
   Vertrieb für BRD: Höchst AG, Frankfurt
3. Parvaquone (Clexon^{R}) (P)
   2-hydroxy-3-cyclohexyl-1,4-naphtoquinon (McHARDY, 1979)
   Hersteller: Fa. Wellcome Research Laboratories, Kent, U.K.

Es lagen jeweils die Reinsubstanzen in Pulverform vor. Bis auf Halofuginonaceturat und -lactat waren alle Substanzen hydrophob und mußten daher mit Alkohol gelöst werden. Nach KOHLMEYER (1983) erbrachten folgende Konzentrationen in vitro einen optimalen Wirkungsspiegel bei möglichst geringer Zytotoxizität:

Bay g 7183	:	25	µg/ml
Halofuginon	:	0,025	µg/ml
Parvaquone	:	1	µg/ml

Zunächst wurde eine Stammlösung hergestellt, wobei 5 mg der hydrophilen Substanzen mit 10 ml Medium versehen wurden. Die

gleiche Menge der hydrophoben Wirkstoffe mußte dagegen zuerst mit 50 µl Äthanol unter Schütteln gelöst werden. Anschließend wurden die restlichen 9950 µl Nährmedium zugefügt. Wenn aus dieser Stammlösung 50 µl entnommen und in 950 µl Medium pipettiert wurden, betrug die Medikamentenkonzentration 25 µg/ml. Um eine Konzentration von 1 µg/ml zu erreichen, mußte die Stammlösung um 1:25, und um 0,025 µg/ml zu erhalten, um 1:1000 verdünnt werden. Vor ihrer Anwendung wurde die Wirkstofflösung mit einem Filter (SM 16 527; Fa. Sartorius, Göttingen) sterilisiert.
Jeweils 5 x 10^5 Kulturzellen/ml wurden mit den Chemotherapeutika versetzt und 72 Stunden bei 37°C mit 5 % CO_2 und 96% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank aufbewahrt. Die Inkubation erfolgte in Tissue Culture Cluster-Platten (Lochdurchmesser 16 mm; Fa. Costar, Cambridge, Mass. U.S.A.). Gleichzeitig wurde eine Kontrolle mit unbehandelten Zellen angesetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen durch kräftiges Spülen gelöst, in einem Zentrifugenröhrchen zweimal bei 4°C und 150 x g 10 Minuten lang gewaschen, nach obiger Methode gezählt und auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

Um die Eigenschaften der behandelten Kulturzellen zu bestimmen, wurden folgende Untersuchungen durchgeführt.

1. Die Bestimmung des Schizontenindex (Prozentsatz der mit Schizonten befallenen Zellen) erfolgte nach zwei verschiedenen Methoden:
a) der Schizontenindex wurde nach Auszählen von 200 Zellen im Lichtmikroskop bestimmt, nachdem je ein Tropfen der Suspension auf einem Objektträger ausgestrichen und nach GIEMSA angefärbt worden war. Außerdem wurde die Anzahl der Schizontenchromatinpartikel pro Zelle bestimmt.
b) für die Bestimmung des Index mit dem indirekten Fluoreszenzantikörpertest wurden Ausstriche 15 Minuten lang in einem sich im Gefrierschrank befindenden Acetonbad fixiert. Nach Lufttrocknen der Ausstriche wurden auf den Objektträgern zwei kreisförmige Reaktionsfelder markiert. Auf die eine Kreis-

fläche wurde Serum eines T. annulata-immunen Rindes und auf die zweite Serum nicht infizierter Kälber pipettiert. Beide Seren waren zuvor im Verhältnis 1:40 mit Phosphatpuffer (PBS, siehe Anhang S. 32, Nr. 1) verdünnt worden. Die Objektträger mußten dann 40 Minuten in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert werden. Im Anschluß erfolgte eine dreimalige Waschung in PBS und eine letzte in aqua dest. Jeder Waschvorgang dauerte fünf Minuten. Nachdem die Ausstriche erneut getrocknet waren, wurde eine Evans-blue-Stammlösung (s. Anhang, S. 32, Nr. 2) im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt und zu gleichen Teilen mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)-konjugiertem Anti-Rinder-Serum (Fluorescein Conjugated Anti-Bovine IgG, Fa. Cappel Laboratories, Cochranville, U.S.A.) auf die Reaktionsfläche aufgetragen. Die Objektträger wurden wieder für 40 Minuten in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Nachdem die Ausstriche wie oben gewaschen und luftgetrocknet waren, wurden sie mit Glycerin-Carbonat-Puffer (1:10) eingedeckelt. Mit einem Fluoreszenz-Mikroskop (Fa. Zeiss, Oberkochen; Mikroskop UNIVERSAL mit Quecksilberlampe HBO 200 W L1, Nr.: 03010 K, Filterkombination 09: 2 Erregerfilter = KP 500, Sperrfilter = LP 520 und Farbteiler = 510) wurden im Auflicht ebenfalls 200 Zellen ausgezählt.

Um die Lebensfähigkeit von Wirtszelle und Parasit zu bestimmen, wurde die von FORD (1978) beschriebene Fluoreszenzfärbung angewendet. Hierfür wurden 0,01 mg Ethidium-Bromid (Fa. Serva, Heidelberg) und 0,005 mg Acridin-Orange (Fa. Merck, Darmstadt) in je 1 ml PBS gelöst. Auf einem Objektträger wurden 25 µl der zu färbenden Zellsuspension mit 10 µl der Ethidium-Bromid-Lösung gemischt. Nach 30 Sekunden wurden 10 µl der Acridin-Orange-Lösung zugefügt. Betrachtete man nun die Zellen mit einem Fluoreszenz-Mikroskop im Auflicht, erschienen die toten Zellbestandteile rot, während die lebenden grün leuchteten.

2. Um die Stimualtionsantwort der Kulturzellen zu überprüfen, wurde die One Way Mixed Lymphocyte Reaction (in Anlehnung an die Methoden von BACH und VOYNOW, 1966) durchgeführt. Als

Stimulartorzellen dienten unbehandelte und behandelte T. annulata-infizierte Lymphoblasten von den Kälbern Nr. 209 und Nr. 210. Als antwortende Zellen (Responder) wurden nicht infizierte PBL der Tiere Nr. 1, 7, 209 und 210 eingesetzt. Das Nährmedium wurde mit einer 2-Mercapto-Äthanol-Lösung (5×10^{-5} Mol/l; Fa. Merck, Darmstadt) versehen. Um die weitere Teilungsfähigkeit der Stimulatorzellen zu verhindern, wurden sie in einer Konzentration von 1×10^7/ml mit 20 µl Mitomycin C/ml (Fa. Serva, Heidelberg) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und danach zweimal bei 150 x g und 4°C 10 Minuten lang mit Nährmedium gewaschen und auf eine Dichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt.

Die Responder-Lymphozyten wurden auf eine Konzentration von $2,5 \times 10^6$/ml verdünnt. Vorversuche ergaben unter Verwendung dieser Zellkonzentrationen optimale Reaktionen. In PS-Mikrotiterplatten 96 K, U-Form (Fa. Greiner GmbH, Nürtingen) wurden jeweils 100 µl Stimulator- und 100 µl Responderzellen in autologer und allogener Kombination eingefüllt. Zur Kontrolle wurden 100 µl Stimulator- bzw. 100 µl Responderzellen alleine mit 100 µl Nährmedium aufgetragen. Von jeder Probe wurden Triplikate angelegt.

Die Inkubationszeit der MLR betrug insgesamt 142 - 144 Stunden. Nach 120 Stunden wurden 20 µl radioaktiv markiertes ^{3}H-Thymidin (Fa. Amersham Buchler, Braunschweig; spezifische Aktivität = 2 µCI/ml) zugegeben, das während der Mitose in die Zell-DNA eingebaut werden sollte.

Zu einigen Versuchen wurden die Stimulator-Responder-Zellsuspensionen, bzw. Stimulatorzellsuspensionen mit Medium oder Responderzellsuspensionen mit Medium am fünften Inkubationstag geerntet, erneut mit Mitomycin C behandelt und als Stimulatorzellgemisch mit PBL als Responder bzw. mit Medium zur Kontrolle inkubiert. 120 Stunden nach der letzten Mitomycin C-Zugabe wurde ^{3}H-markiertes Thymidin einpipettiert und 22 - 24 Stunden später wurden die Zellen mit einem Zellsammler (MASH II; Fa. Flow Laboratories, Bonn) aus den Mikrotiterplatten abgesaugt und auf Filterpapierstreifen (Fa. Whatman, Ferrières, Frankreich) gesammelt. Nach zweistündigem Trocknen wurden kreis-

förmig Papierplättchen ausgestanzt, mit einer Pinzette herausgelöst und in ein Gefäß (Fa. Zinsser, Frankfurt) mit 2 ml Biofluor^{R}-Szintillationsflüssigkeit (Fa. Beckmann Instruments International SA, München) verbracht. Mit einem ß-Counter (Fa. LKB Instruments GmbH, Berlin; Rackbeta Liquid Szintillations Counter) wurden "counts per minute" (cpm) ermittelt und über einen angeschlossenen Schreiber (Fa. Teleprint GmbH, Echborn, Frankfurt; Model 43) ausgedruckt. Die Menge des ^{3}H-Thymidineinbaus wird als Maß für das Zellwachstum benutzt.

3. Um eine Stimulation mit Mitogenen durchzuführen, wurden therapierte bzw. nicht therapierte Theilerien-infizierte Kulturlymphoblasten bzw. PBL nicht infizierter Kälber auf eine Konzentration von 5 x 10^{5} Lymphozyten/ml gebracht. Als Mitogene wurden Concanavalin A (Fa. Biochrom, Berlin), Phytohämagglutinin (Fa. Difco Laboratories, Detroit Michigan, U.S.A.) und Pokeweed-Mitogen (Fa. Biochrom, Berlin) in folgenden Konzentrationen angewendet:

Con A	= 4 µg/ml	Zellsuspension
PHA	= 16 µg/ml	"
PWM	= 8 µg/ml	"

Die lyophilisiert vorliegenden Lektine wurden mit RPMI-Medium in geeignete Stammlösungen vorverdünnt, sterilisiert (Filter SM 16 527, Fa. Sartorius, Göttingen), zu je 1 ml portioniert und bei -28°C bis zur Verwendung aufbewahrt. Je 200 µl einer Zellsuspension wurde in jeweils drei Löcher einer PS-Mikrotiterplatte 96 K (Fa. Greiner GmbH, Nürtingen) einpipettiert, das Mitogen zugegeben, die Platte verdeckelt und für 72 Stunden im CO_2-Brutschrank inkubiert. Nach 66 Stunden wurden 20 µl ^{3}H-Thymidin zugegeben, um wie bei der MLR die Stärke des Zellwachstums erfassen zu können.

Sowohl bei der MLR als auch bei der Mitogenstimulation wurden die Mittelwerte (cpm $\bar{x}$) der Triplikate als Ergebnisse festgehalten. In den Tabellen wurde in Klammern der Bereich (niedrigster und höchster Einzelwert) angegeben. Eine Aussage über die Höhe der jeweiligen Stimulation macht der Stimulationsin-

dex (si). Er setzt sich bei der MLR aus dem Verhältnis der Differenz von cpm $\bar{x}$ der MLR-Kombination und cpm $\bar{x}$ des Stimulators zu cpm $\bar{x}$ des Responders zusammen (HAN und MINOWADA, 1973).

$$si = \frac{\text{cpm } \bar{x} \text{ der MLR-Kombination - cpm } \bar{x} \text{ des Stimulators}}{\text{cpm } \bar{x} \text{ des Responders}}$$

Bei der Mitogenstimulation wurde der Stimulationsindex aus dem Verhältnis von cpm $\bar{x}$ der mit Mitogen versehenen Zellen zu cpm $\bar{x}$ der Kontrollzellen ermittelt.

$$si = \frac{\text{cpm } \bar{x} \text{ der Zellen mit Mitogen}}{\text{cpm } \bar{x} \text{ der Zellen ohne Mitogen}}$$

4. Zur weiteren Charakterisierung der behandelten und nicht behandleten T. annulata-befallenen Lymphozyten wurden außerdem E-, EA- und EAC-Rosettentests durchgeführt. Die für die Rosettierung benötigten Schaferythrozyten wurden aus dem Jugularvenenblut gewonnen, das zu gleichen Teilen mit Alseverlösung (siehe Anhang S. 32, Nr. 3) verdünnt worden war. Für die E- und EAC-Tests mußten die Proben dreimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen werden, während für die EA-Tests dreimalige Waschungen mit PBS notwendig waren. Die Zentrifugationen erfolgten bei 1200 x g und 4°C 10 Minuten lang. Der Überstand wurde jeweils mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

Für die E-Rosettenkomplexherstellung wurden gepackte Schaferythrozyten im Verhältnis 1:4 mit S-2-Aminoethylisothiuroniumbromid x HBr (AET) gemischt und 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Das AET mußte zuvor frisch in aqua dest. gelöst (0,1 Mol/l) und der pH mit 4 normaler NaOH auf 9,0 eingestellt werden. Das Auswaschen der AET aus der Zellsuspension erfolgte dreimal mit 0,9%iger NaCl-Lösung. Anschließend wurden die Erythrozyten als 1%ige Gebrauchssuspension in RPMI-Medium mit 6% Dextranzusatz aufbewahrt.
Für die EA-Rosettierung mußte eine 5%ige Erythrozytensuspension im Verhältnis 1:1 mit einem 1:500 verdünnten Ambozeptor (Fa. Behring-Werke, Marburg) vermischt und eine Stunde lang

bei 37°C im Wasserbad inkubiert werden. Es folgte eine dreimalige Waschung in PBS. Mit RPMI-Medium wurde aus dem Sediment eine 5%ige Gebrauchssuspension hergestellt. Um EAC-Rosettenkomplexe zu gewinnen, mußten die gepackten Erythrozyten zu einer 5%igen Suspension mit Veronal-Gelatine-Puffer (siehe Anhang S. 32, Nr. 4) verdünnt werden. Die Zellsuspension wurde zu gleichen Volumenteilen mit 1:300 verdünntem Anti-Schaferythrozytenserum (siehe Anhang S. 32, Nr. 5) gemischt. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C und dreimaliger Waschung in Veronal-Gelatine-Puffer wurden die Erythrozyten wieder auf eine 5%ige Suspension eingestellt. Frisch gewonnenes Mäuseserum, das 1:10 mit 0,1%igem Veronal-Gelatine-Puffer verdünnt worden war, diente als Komplementspender. Zu gleichen Teilen wurde die Zellsuspension mit dem Mäuseserum vermengt, bei 37°C für 35 - 40 Minuten inkubiert, dann dreimal in Veronal-Gelatine gewaschen und auf eine 1%ige Gebrauchssuspension mit Veronal-Gelatine-Puffer gebracht.

Die E-, EA- und EAC-Komplexe konnten sechs Tage lang bei 4°C aufbewahrt werden.

Zur Durchführung des E-Rosettentests wurden 200 µl der Gebrauchssuspension mit 200 µl der behandelten und unbehandelten Kulturzellen bzw. der PBL nicht infizierter Kälber (2×10^6 Zellen/ml) in SABIN-FELDMANN-Röhrchen gemischt, bei 37°C 15 Minuten lang inkubiert und währenddessen alle fünf Minuten geschüttelt. Nach einer Zentrifugation mit 100 x g bei 4°C fünf Minuten lang wurden die Proben für 18 - 20 Stunden in den Kühlschrank gestellt.

Um den EA-Rosettentest anzuwenden, wurden 50 µl der EA-Gebrauchssuspension mit 450 µl der behandelten und unbehandelten Kulturzellen bzw. PBL nicht infizierter Kälber (2×10^6 Zellen/ml) gemischt, fünf Minuten lang mit 100 x g bei 4°C zentrifugiert und 1 1/2 - 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Für die Durchführung des EAC-Rosettentest mußten 200 µl der EAC-Gebrauchssuspension mit 200 µl der behandelten und unbehandelten Kulturzellen bzw. PBL nicht infizierter Kälber (2×10^6 Zellen/ml) vermengt, fünf Minuten bei 100 x g zentrifugiert und für 18 - 20 Stunden bei 4°C inkubiert werden.

Neben den Rosettenversuchen mit den oben beschriebenen Zellkonzentrationen wurden noch zwei Rosettentests mit der doppelten Konzentration Theilerien-infizierter behandelter bzw. unbehandelter Zellen und mit der doppelten Konzentration (= 4 x 10^6 Zellen/ml) der nicht infizierten PBL durchgeführt. In einem weiteren Versuch wurden Erythrozytensuspensionen, deren Zellkonzentrationen um die Hälfte bzw. einem Viertel verringert worden waren, zu unbehandelten Kulturzellen, nicht infizierten PBL bzw. einem Gemisch gleicher Teile von beiden vorhergenannten Zelltypen gegeben.

Zur Auswertung der Rosettentests wurden die jeweils im Triplikat angefertigten Proben sehr vorsichtig resuspendiert und mit 50 µl Brillant-Cresyl-Blau-Stammlösung (siehe Anhang S. 32, Nr. 6) angefärbt. In einer NEUBAUER-Zählkammer wurde von mindestens 200 Kulturzellen der Prozentsatz der rosettierten Lymphozyten bestimmt. Zu den rosettenbildenden Zellen zählten die blau gefärbten, an denen jeweils drei oder mehr Erythrozyten adhärierten.

Anhang zu 3.1.

1. PBS 8,0 g NaCl; 0,2 g KH_2PO_4; 2,9 g $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$; 0,2 g KCl ad 1000 ml Aqua dest.

2. Evans-blue-Stammlösung: 1 g Evans-blue (Fa. Merck, Darmstadt) ad 1000 ml PBS.

3. Alseverlösung: 18,66 g Glukose; 4,18 g NaCl, 8,0 g Na-Citrat $\cdot$ 2 H_2O ad 1000 ml Aqua dest.

4. Stammlösung für Veronal-Gelatine-Puffer pH 7,2 - 7,4; 5 x konzentriert:
   41,5 g NaCl, 5,09 g 5,5-Diaethylbarbiturat-Na ad 1000 ml Aqua dest. Gebrauchslösung: Zusatz von 0,1 ml einer 2 M $MgCl_2$- und 0,3 M $CaCl_2$-Lösung sowie 100 mg Gelatine auf 100 ml der mit Aqua dest. 1:5 verdünnten Stammlösung.

5. Anti-Schaferythrozytenserum:
   Einem Kaninchen werden 2 ml einer 10%igen frischen SRBC-Suspension an drei aufeinanderfolgenden Tagen intravenös verabreicht. Nach zweitägiger Pause erfolgen zwei weitere Injektionen im Abstand von einem Tag, so daß am 8. - 9. Tag nach der Erstinjektion das Antiserum gewonnen werden kann.

6. Brillant-Cresyl-Blau-Stammlösung:
   1 g Brillant-Cresyl-Blau wird mit 100 ml 3,8%iger Na-Citrat-Lösung gemischt und 1:4 mit 0,9%iger NaCl-Lösung verdünnt.

3.2 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte der Einfluß der Chemotherapeutika Bay g 7183, Halofuginonaceturat, -hydrobromid, -lactat und Parvaquone auf morphologische Veränderungen und funktionelle Eigenschaften T. annulata-infizierter Lymphoblasten untersucht werden. Als charakteristische Merkmale der T. annulata-befallenen Kulturzellen wurden sowohl der Schizontenindex und die Fähigkeit, PBL im Rahmen einer Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) zu stimulieren, als auch die Eigenschaft, sich durch Mitogene stimulieren zu lassen, und das Verhalten gegenüber E-, EA- und EAC-Rosettenkomplexen herangezogen.

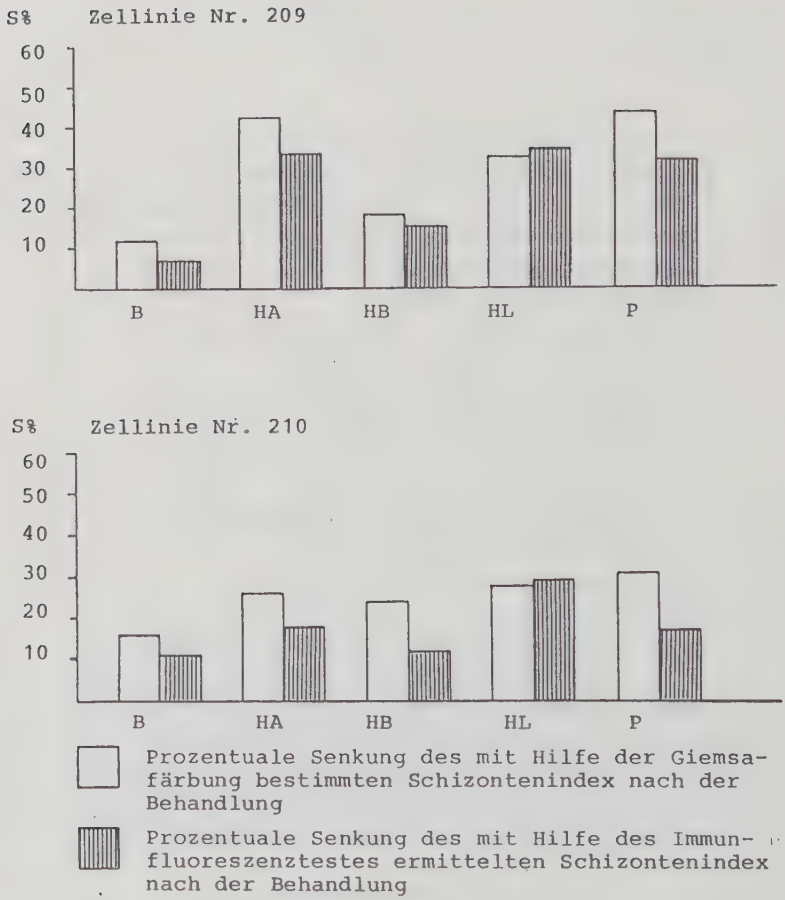
3.2.1. Einfluß der Chemotherapeutika auf den Index und die Partikelanzahl der Theileria annulata-Schizonten und auf die Vitalität der Parasiten und ihrer Wirtszellen

Der Schizontenindex, d.h. der prozentuale Befall der Kulturzellen mit Theileria-Schizonten, war ein wichtiger vergleichender Parameter in allen Versuchen, in denen die Eigenschaften Theilerien-infizierter Kulturzellen untersucht werden sollten.
Er wurde zunächst mit Hilfe der Giemsafärbung ermittelt. Die Kulturlymphoblasten, die vom Tier Nr. 209 abstammten, waren durchschnittlich zu 84%, und diejenigen, welche vom Kalb Nr. 210 gewonnen worden waren, zu 89% mit Schizonten befallen. Die Therapie der Kulturzellen Nr. 209 mit Bay g 7183 bewirkte einen durchschnittlichen Schizontenrückgang um 12%, mit Halofuginonaceturat um 42%, mit Halofuginonhydrobromid um 18%, mit Halofuginonlactat um 32% und mit Parvaquone um 43%. Bei den Lymphoblasten Nr. 210 konnte eine durchschnittliche Verringerung des Schizontenindex durch Bay g 7183 um 17%, durch Halofuginonaceturat um 26%, durch Halofuginonhydrobromid um 24%, durch Halofuginonlactat um 28% und durch Parvaquone um 31% beobachtet werden (Fig. 1, S. 36; Tab. 1, S. 56).

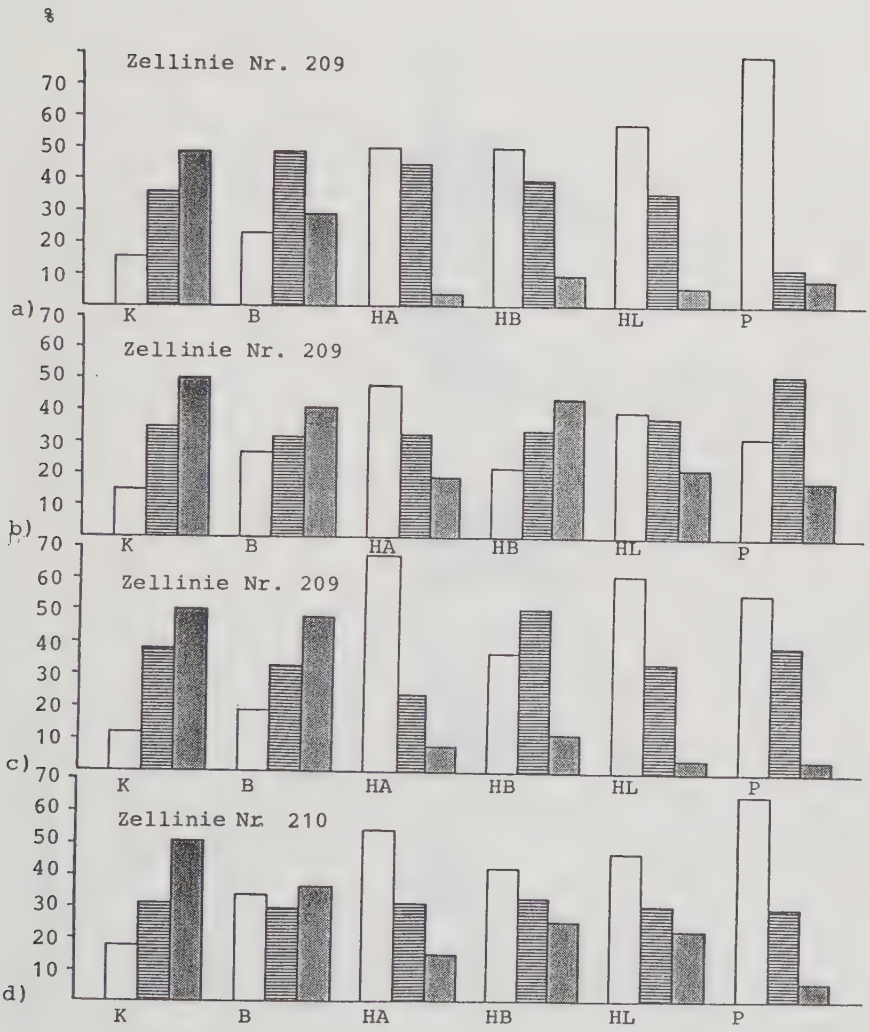
Die im Rahmen des Immunfluoreszenztestes ausgezählten durchschnittlichen Schizontenindices ergaben bei den Kontrollkulturzellen Nr. 209 88% befallene Zellen und bei den Lymphoblasten Nr. 210 93%. Die Schizontenindices waren bei Nr. 209 nach der Behandlung mit den verschiedenen Chemotherapeutika zwischen 7 und 34% und bei Nr. 210 um 11 - 29% gesunken. Die Werte sind im einzelnen in Tab. 1 und Fig. 1 aufgezählt.
Die Auszählung der Anzahl der Schizontenpartikel in Giemsagefärbten Lymphoblasten zeigte folgendes Ergebnis:
12 - 18% der unbehandelten befallenen Lymphoblasten enthielten 1 - 5 Schizontenpartikel, 31,5 - 38% 6 - 10 und 48,5 -50,5% mehr als 10. Die geringste Verschiebung der Partikelverhältnisse erfolgte nach der Bay g 7183-Therapie. Eine Behandlung mit Halofuginonaceturat, -hydrobromid, -lactat oder Parvaquone hingegen ließ die Partikelzahl deutlich sinken (Fig. 2, S. 37; Tab. 2, S. 57).
Die zur Bestimmung der Vitalität von Wirtszelle und Schizont unternommene Fluoreszenzfärbung mit Ethidium-Bromid und Acridin-Orange zeigte, daß 74% aller unbehandelten T. annulata-befallenen Kulturzellen am Leben waren und lebende Schizonten enthielten, 6% der lebenden infizierten Lymphoblasten besaßen tote Schizonten und bei 20% waren bereits Wirtszelle und Parasit abgestorben. Die Behandlung mit Bay g 7183 ergab nur geringfügige Veränderungen gegenüber den Kontrollen. 76% der befallenen Kulturzellen lebten und enthielten lebende Schizonten, 3% der lebenden Lymphoblasten beinhalteten tote Schizonten, bei 14% waren Zelle und Parasit abgestorben, während 7% toter Wirtszellen noch lebende Parasiten beinhalteten. Nach der Therapie mit Halofuginonaceturat war die Zahl lebender Zellen mit toten Schizonten auf 40%, nach Halofuginonhydrobromidbehandlung auf 33%, nach dem Einfluß von Halofuginonlactat auf 24% und von Parvaquone auf 38% angestiegen (Fig. 3, S. 38; Tab. 3, S. 58).

Legende für Tab. 1-16 und Fig. 1-9 :

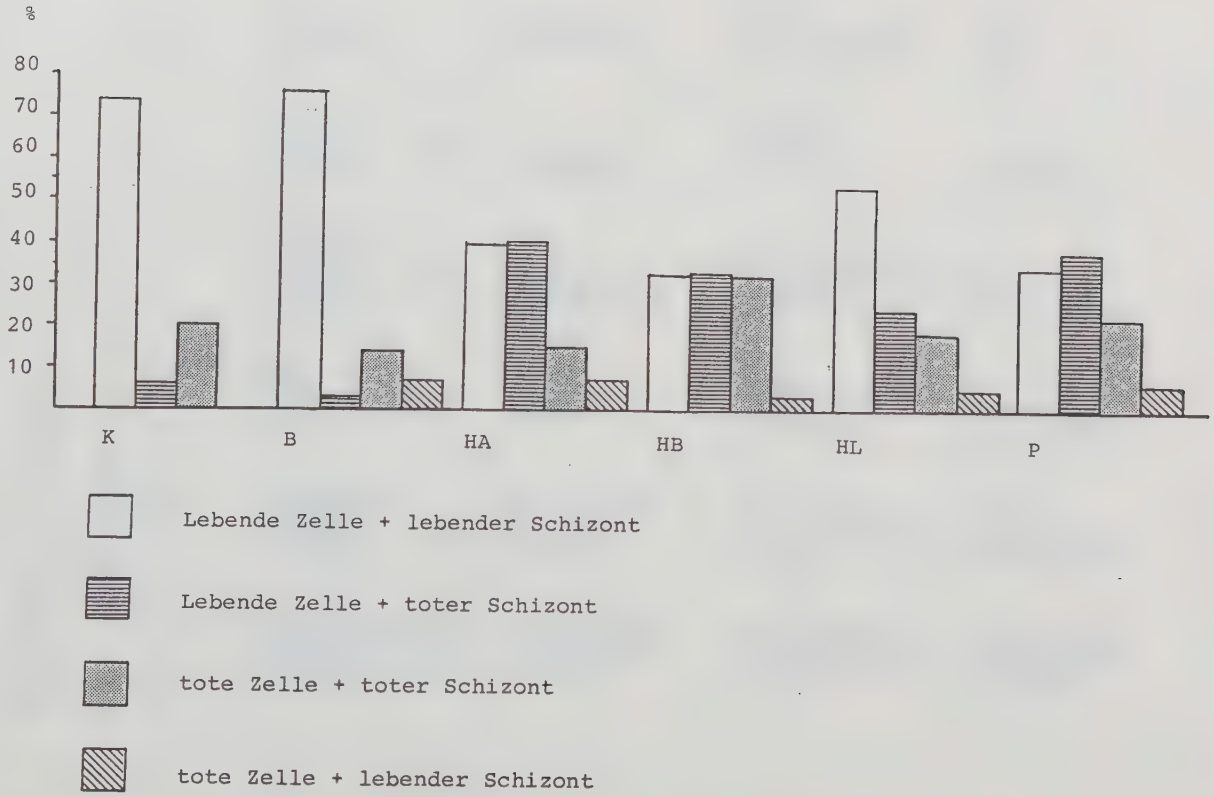
K : T. annulata-befallene Kulturzellen
K 209: T. annulata-befallene Kulturzellen des Kalbes Nr. 209
K 210: T. annulata-befallene Kulturzellen des Kalbes Nr. 210
K 255: T. annulata-befallene Kulturzellen des Kalbes Nr. 255
B : T. annulata-befallene Kulturzellen nach der Behandlung mit Bay g 7183
HA: T. annulata-befallene Kulturzellen nach der Behandlung mit Halofuginonaceturat
HB: T. annulata-befallene Kulturzellen nach der Behandlung mit Halofuginonhydrobromid
HL: T. annulata-befallene Kulturzellen nach der Behandlung mit Halofuginonlactat
P: T. annulata-befallene Kulturzellen nach der Behandlung mit Parvaquone
PBL : frische periphere Blutlymphozyten
PBL 1: frische periphere Blutlymphozyten des Kalbes Nr. 1
PBL 7: frische periphere Blutlymphozyten des Kalbes Nr. 7
PBL 85: frische periphere Blutlymphozyten des Kalbes Nr. 85
PBL 92: frische periphere Blutlymphozyten des Kalbes Nr. 92
PBL 209: frische periphere Blutlymphozyten des Kalbes Nr. 209
PBL 210: frische periphere Blutlymphozyten des Kalbes Nr. 210
PBL 238: frische periphere Blutlymphozyten des Kalbes Nr. 238
PBL 255: frische periphere Blutlymphozyten des Kalbes Nr. 255



Figur 1: Einfluß der Chemotherapeutika auf den Schizontenindex T. annulata-befallener Kulturzellen.



Figur 2: Einfluß der Chemotherapeutika auf die Anzahl der Schizontenpartikel Giemsa-gefärbter T. annulata-befallener Kulturzellen.



Figur 3: Prozentualer Lebend-Tot-Anteil T. annulata-befallener

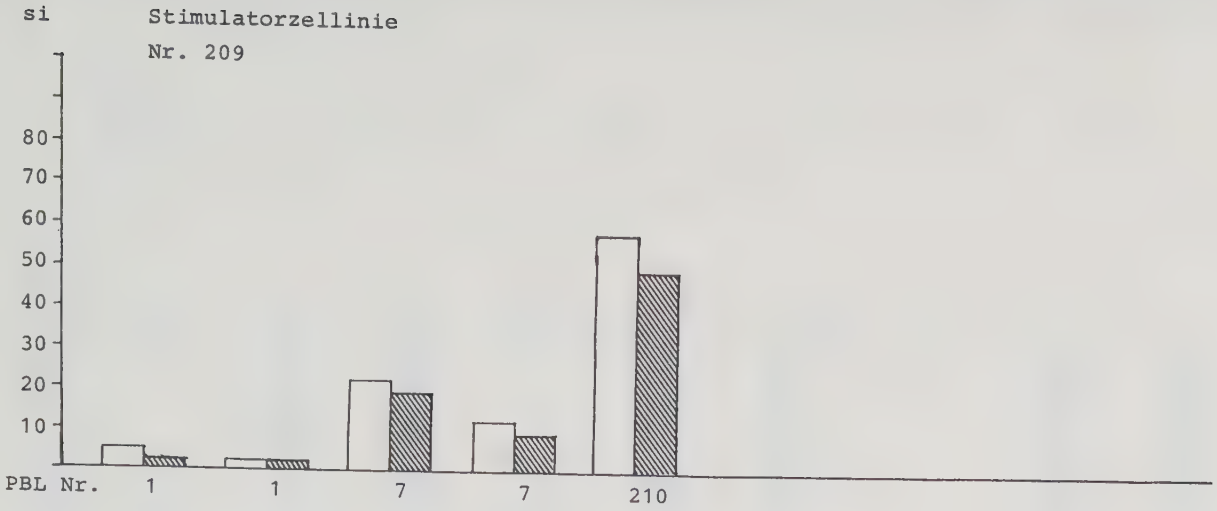
3.2.2. Einfluß der Chemotherapeutika auf die Stimulationsfähigkeit Theileria annulata-befallener Kulturzellen

T. annulata-befallene Zellen regen nichtinfizierte autologe und allogene PBL zur Blastogenese an. Um festzustellen, ob diese stimulierende Wirkung auf die Anwesenheit der Schizonten in der Wirtszelle zurückzuführen ist, wurden zwei Linien infizierter Zellen (K 209 und K 210) mit verschiedenen Chemotherapeutika behandelt und anschließend mit PBL nichtinfizierter Tiere kultiviert.
In den Figuren Nr. 4 - 8 (S. 41 - 45) und den Tabellen Nr. 4 - 8 (S. 59 -65) wurden die Stimulationsindices der einzelnen Versuche zusammengefaßt, wobei sie vor der Chemotherapie im autologen System (K 209 gegen PBL 209, K 210 gegen PBL 210) zwischen 5,0 und 82,0 und im allogenen System zwischen 2,7 und 89,0 lagen.

Nach der Behandlung mit Bay g 7183 unterschieden sich die Stimulationsindices fünf einzelner Versuche nur geringfügig von den Ergebnissen der MLR mit unbehandelten Kontrollkulturzellen (Fig. 4, S. 41; Tab. 4, S. 59).
Die Chemotherapie der Stimulatorzellen mit Halofuginonaceturat bewirkte weder in zwei autologen noch in sieben allogenen MLR's eine deutliche Hemmung. Bei vier allogenen Kombinationen traten sogar stärkere Reaktionen als bei den Kontrollversuchen auf (Fig. 5, S. 42; Tab. 5, S. 60 - 61).
Unter Verwendung von Halofuginonhydrobromid war die stimulierende Fähigkeit der Kulturzellen in fünf allogenen MLR's ebenfalls nicht negativ beeinflußt worden. Wie der Tabelle Nr. 6 (S. 62 - 63) und der Figur Nr. 6 (S. 43) zu entnehmen ist, differierten die Ergebnisse nicht wesentlich von den Kontrollwerten. Bei zwei autologen Kombinationen war der Stimulationsindex nach der Behandlung um 10% gestiegen bzw. um 27,5% gesunken. Die Unterschiede sind statistisch nicht bedeutsam.

Auch die cpm $\bar{x}$-Werte der sechs durchgeführten Versuche mit Halofuginonlactat-behandelten Kulturzellen wichen nur unwesentlich von den Kontrollwerten ab (Fig. 7, S. 44; Tab. 7, S. 64).
Das Naphtoquinonderivat Parvaquone hatte in zwei Versuchen eine hemmende Wirkung auf die stimulierende Fähigkeit T. annulata-befallener Zellen ausgeübt. In vier Versuchen hingegen, so auch bei einer autologen MLR, hatte Parvaquone keinen stimulationshemmenden Einfluß (Fig. 8, S. 45; Tab. 8, S. 65).

Wie bereits im Kapitel 3.2.1. beschrieben worden ist, wirkten die Chemotherapeutika unterschiedlich auf den Schizontenindex und die Vitalität von Schizont und Wirtszelle. Deshalb lag die Vermutung nahe, daß die Behandlung mit den verschiedenen Substanzen ebenso variierende Einflüsse auf die stimulierende Wirkung der befallenen Zellen hat. Wider Erwarten aber blieb diese Eigenschaft T. annulata-befallener Zellen nach der Chemotherapie gleichermaßen unverändert. Es stellte sich daher die Frage, ob die PBL-stimulierende Fähigkeit der mit Mitomycin C behandelten Kulturzellen im Laufe der Inkubation auf nichtinfizierte PBL übertragen worden waren.
Deshalb wurden die hauptsächlich nur noch aus PBL bestehenden Zellen der Stimulator-Responder-Kombination der oben durchgeführten Versuchsreihen am fünften Inkubationstag mit Mitomycin C behandelt und wiederum als Stimulatorzellgemisch erneut mit PBL inkubiert. Handelte es sich in beiden Inkubationsschritten um Responderzellen des gleichen Tieres, konnte keine Stimulation beobachtet werden. Denn nach der Verwendung sowohl behandelter als auch unbehandelter Kulturzellen blieben die Stimulationsindices kleiner als eins. Verwendete ich beim zweiten Inkubationsschritt PBL eines anderen Tieres, wurden Stimulationsindices zwischen 1,5 und 4,2 erreicht (Tab. 9, S. 46).

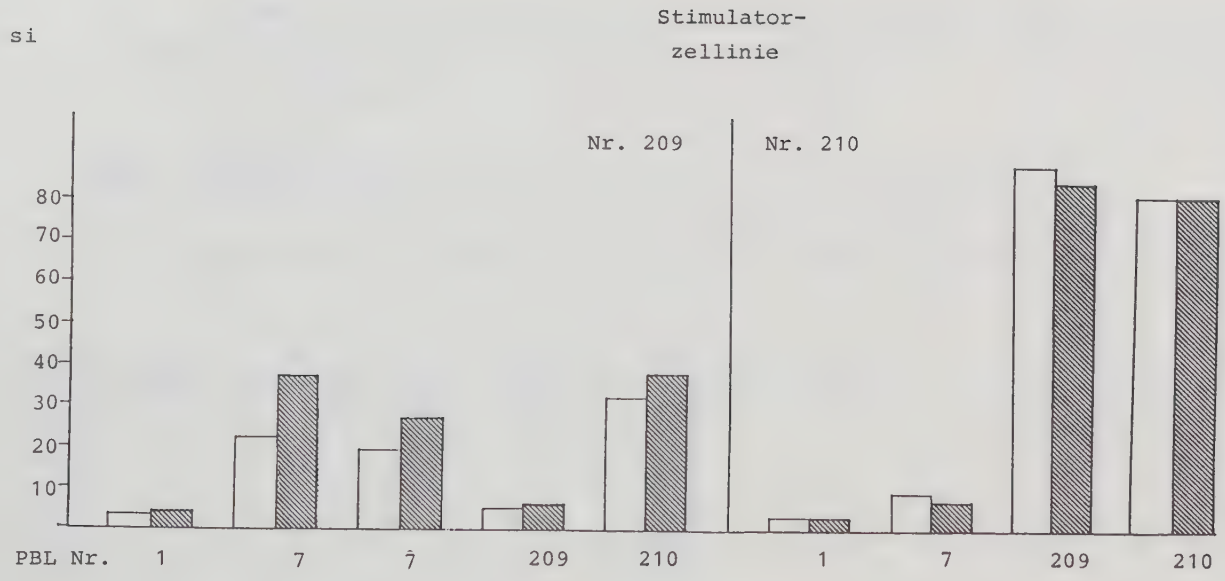


unbehandelte T. annulata-infizierte Kulturzellen als Stimulatoren

mit Bay g 7183 behandelte T. annulata-infizierte Kulturzellen als Stimulatoren

si: Stimulationsindex

Figur 4: Stimulationsindices der Mixed Lymphocyte Reactions zwischen unbehandelten und mit Bay g 7183 behandelten T. annulata-befallenen Kulturlymphoblasten als Stimulatoren und PBL als Responder

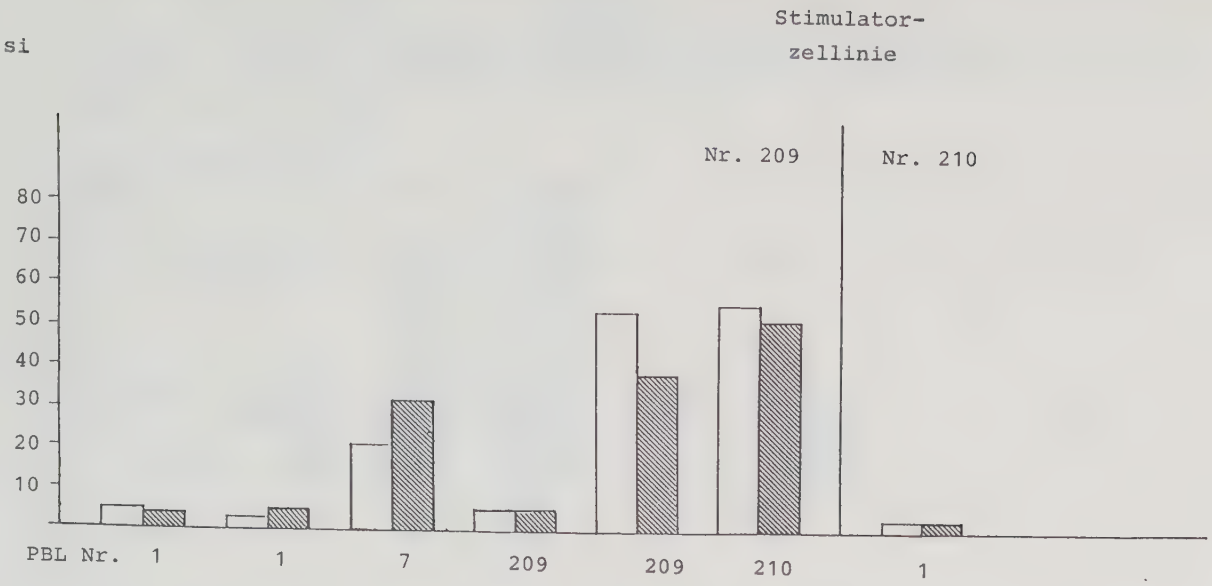


unbehandelte T. annulata-infizierte Kulturzellen

mit Halofuginonaceturat behandelte T. annulata-infizierte Kulturzellen

si: Stimulationsindex

Figur 5: Stimulationsindices der Mixed Lymphocyte Reactions zwischen unbehandelten und mit Halofuginonaceturat behandelten T. annulata-befallenen Kultur-

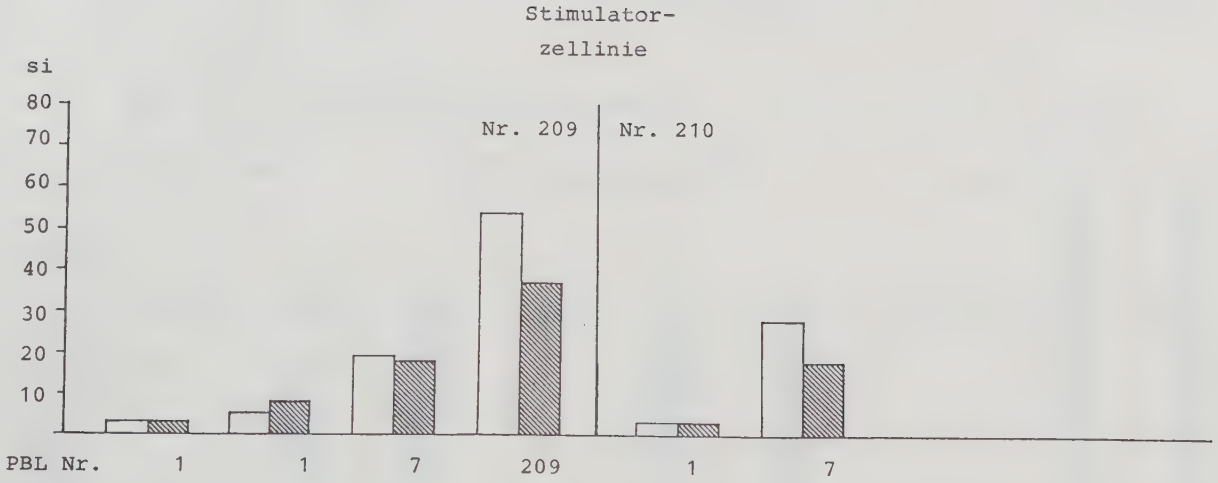


unbehandelte T. annulata-infizierte Kulturzellen als Stimulatoren

mit Halofuginonhydrobromid behandelte T. annulata-infizierte Kulturzellen als Stimulatoren

si : Stimulationsindex

Figur 6: Stimulationsindices der Mixed Lymphocyte Reactions zwischen unbehandelten und mit Halofuginonhydrobromid behandelten T. annulata-befallenen Kulturlymphoblasten als Stimulatoren und PBL als Responder

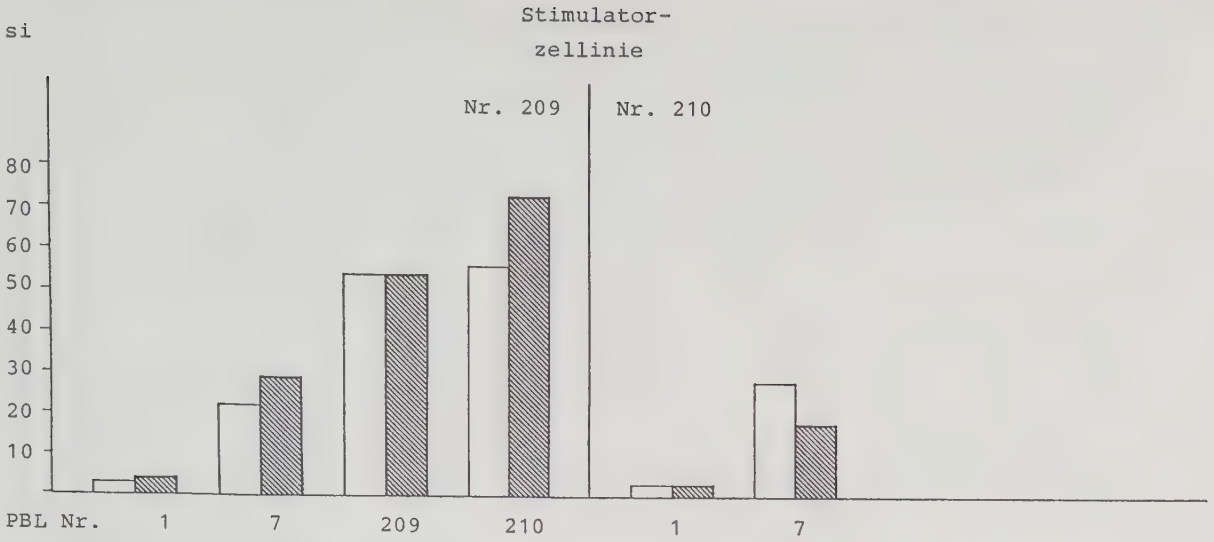


unbehandelte T. annulata-infizierte Kulturzellen als Stimulatoren

mit Halofuginonlactat behandelte T. annulata-infizierte Kulturzellen als Stimulatoren

si : Stimulationsindex

Figur 7: Stimulationsindices der Mixed Lymphocyte Reactions zwischen unbehandelten und mit Halofuginonlactat behandelten T. annulata-befallenen Kulturlymphoblasten als Stimulatoren und PBL als Responder



unbehandelte T. annulata-infizierte Kulturzellen als Stimulatoren

mit Parvaquone behandelte T. annulata-infizierte Kulturzellen als Stimulatoren

si : Stimulationsindex

Figur 8: Stimulationsindices der Mixed Lymphocyte Reactions zwischen unbehandelten und mit Parvaquone behandelten T. annulata-befallenen Kulturlymphoblasten als Stimulatoren und PBL als Responder

Zellkombination	cpm $\bar{x}$		si
(K 210 m + PBL 1)m + Medium	175	(162- 188)	--
(B 210 m + PBL 1)m + Medium	111	(104- 122)	--
(HA 210 m + PBL 1)m + Medium	117	(94- 140)	--
(HB 210 m + PBL 1)m + Medium	119	(80- 156)	--
(HL 210 m - PBL 1)m + Medium	101	(74- 118)	--
(P 210 m + PBL 1)m + Medium	221	(146- 266)	--
PBL 1 + Medium	964	(708-1112)	--
PBL 7 + Medium	400	(308- 502)	--
(K 210 m + PBL 1)m + PBL 1	788	(720- 830)	0,6
(B 210 m + PBL 1)m + PBL 1	732	(642- 866)	0,6
(HA 210 m + PBL 1)m + PBL 1	667	(618- 750)	0,6
(HB 210 m + PBL 1)m + PBL 1	612	(518- 702)	0,5
(HL 210 m + PBL 1)m + PBL 1	759	(694- 836)	0,7
(P 210 m + PBL 1)m + PBL 1	663	(604- 752)	0,5
(K 210 m + PBL 1)m + PBL 7	1417	(1280-1564)	3,1
(B 210 m + PBL 1)m + PBL 7	1729	(1608-1850)	4,2
(HA 210 m + PBL 1)m + PBL 7	789	(642- 954)	1,7
(HB 210 m + PBL 1)m + PBL 7	701	(594- 774)	1,5
(HL 210 m + PBL 1)m + PBL 7	1070	(794-1516)	2,4
(P 210 m + PBL 1)m + PBL 7	1184	(860-1562)	2,4

Tabelle 9: ^{3}H-Thymidineinbau von Lymphozyten nicht infizierter Kälber nach Stimulation durch Zellgemische, bestehend aus fünf Tage lang miteinander inkubierten Mitomycin C-behandelten Kulturzellen und PBL.
Stimulatorgemisch: $2,5 \times 10^{5}$ Zellen/ml
Responder : $2,5 \times 10^{6}$ Zellen/ml
Inkubationszeit : 144 Stunden
m: Mitomycin C-behandelt
cpm: counts per minute
si: Stimulationsindex
Bei den vorliegenden Werten handelt es sich um den aus 3 Einzelwerten bestehenden arithmetischen Mittelwert, in Klammern wurde der Bereich (niedrigster und höchster Einzelwert) angegeben.

3.2.3. Einfluß der Chemotherapeutika auf die Stimulierbarkeit Theileria annulata-befallener Kulturzellen durch Mitogene

T. annulata-infizierte Kulturzellen der Linie 210 wurden zunächst sowohl vor als auch nach dem Zusatz einzelner Halofuginonsalze mit den Mitogenen Con A, PHA und PWM behandelt. Gleichzeitig wurden nichtinfizierte PBL verschiedener Tiere als Kontrolle zur verstärkten Mitose angeregt (Tab. 10, S. 48; Tab. 11, S. 49).

Die drei Mitogene besaßen eine gute stimulierende Wirkung auf die verwendeten Blutlymphozyten. Die PBL erreichten ohne Mitogen cpm $\bar{x}$-Werte zwischen 198 und 206. Nach dem Mitogeneinfluß wurden im ß-Counter cpm $\bar{x}$-Werte zwischen 7773 und 24939 gemessen. Die nach der in Kapitel 3.1. angegebenen Formel errechneten Stimulationsindices lagen zwischen 37,7 und 126,0 (Tab. 10, 11). Inkubierte man die T. annulata-befallenen Kulturzellen alleine, wurden cpm $\bar{x}$-Werte von 1813 bzw. sogar 19047 erreicht (Tab. 10, 11). Nach der Mitogeneinwirkung hatten sich die cpm $\bar{x}$-Werte nur unwesentlich geändert, so daß die Stimulationsindices bei eins lagen. Auch nach der Behandlung mit den einzelnen Halofuginonsalzen erreichten die infizierten Zellen bereits ohne Mitogene sehr hohe cpm $\bar{x}$-Werte, die sich durch Con A, PHA und PWM nicht mehr steigern ließen. Die Stimulationsindices blieben bei eins (Tab. 10, S. 48; Tab. 11, S. 49).

Daraufhin wurde eine zweite Versuchsreihe an den Kulturzelllinien 209 und 255 mit allen bisher angewandten Chemotherapeutika (Bay g 7183, Halofuginonaceturat, -hydrobromid, -lactat und Parvaquone) durchgeführt. Die Tabellen 12 (S. 50) und 13 (S. 51) zeigen, daß in diesem Falle ähnliche Ergebnisse wie in der ersten Versuchsserie erzielt wurden. Auch Kulturzellen, die mit Bay g 7183 oder mit Parvaquone behandelt worden waren, hatten vermehrt ^{3}H-Thymidin eingebaut. Durch Mitogeneinwirkung konnte die Mitose nicht gesteigert werden. Die nichtinfizierten Kontroll-PBL erreichten hingegen Stimulationsindices von 9,0 bis 48,1.

	ohne Mitogen		Con A		PHA		PWM	
Zellen	cpm $\bar{x}$	si	cpm $\bar{x}$	si	cpm $\bar{x}$	si	cpm $\bar{x}$	si
PBL 210	198 (162- 262)	1	10067 (8790-11792)	50,8	23647 (22036-25488)	119,4	15940 (14632-17248)	80,5
K 210	1813 (1480- 2396)	1	1684 *)	0,9	1776 *)	1,0	1971 (1696- 2170)	1,1
HA 210	5448 (5102- 5850)	1	6107 (5546- 6414)	1,1	5643 (5296- 5836)	1,0	7359 (6988- 7926)	1,4
HL 210	6677 (5806- 8058)	1	6257 (6182- 6322)	0,9	5689 (5306- 6072)	0,9	6800 (6726- 6874)	1,0

Tabelle 10: Mitogen-Stimulation boviner PBL und Theileria annulata-befallener unbehandelter bzw. behandelter Kulturzellen.
Con A : Concanavalin A cpm : counts per minute
PHA : Phytohämagglutinin si : Stimulationsindex
PWM : Pokeweed-Mitogen
Bei den vorliegenden Werten handelt es sich um den aus 3 Einzelwerten bestehenden arithmetischen Mittelwert, in Klammern wurde der Bereich (niedrigster und höchster Einzelwert) angegeben.
*) Es lag nur ein Einzelwert vor.

	ohne Mitogen		Con A		PHA		PWM	
Zellen	cpm $\bar{x}$	si	cpm $\bar{x}$	si	cpm $\bar{x}$	si	cpm $\bar{x}$	si
PBL 209	206 (114- 298)	1	7773 (5988- 9558)	37,7	8915 (7730-10332)	43,3	7946 (7718- 8082)	38,6
PBL 210	198 (162- 234)	1	20302 (18794-21970)	102,5	24949 (24134-25348)	126,0	19629 (16376-21952)	99,1
K 210	19047 (14810-21454)	1	21141 (17402-23554)	1,1	21397 (20220-22926)	1,1	17043 (16778-17266)	0,9
HA 210	7221 (6598- 7830)	1	6896 (6540- 7278)	1,0	5030 (4748- 5490)	0,7	4389 (4108- 4866)	0,6
HB 210	8055 (7406- 8768)	1	7425 (7026- 7752)	0,9	6230 (5610- 6698)	0,8	4493 (4246- 4676)	0,6

Tabelle 11: Mitogen-Stimulation boviner PBL und Theileria annulata-befallener unbehandelter bzw. behandelter Kulturzellen.
Con A : Concanavalin A cpm : counts per minute
PHA : Phytohämagglutinin si : Stimulationsindex
PWM : Pokeweed-Mitogen
Bei den vorliegenden Werten handelt es sich um den aus 3 Einzelwerten bestehenden arithmetischen Mittelwert, in Klammern wurde der Bereich (niedrigster und höchster Einzelwert) angegeben.
*) Es lag nur ein Einzelwert vor.

	ohne Mitogen		Con A		PHA		PWM	
Zellen	cpm $\bar{x}$	si	cpm $\bar{x}$	si	cpm $\bar{x}$	si	cpm $\bar{x}$	si
PBL 209	229 (210- 256)	1	5735 (3622- 7110)	25,0	9896 (8694-11310)	43,2	2974 (2086- 3818)	13,0
PBL 238	282 (208- 326)	1	13104 (11764-14188)	46,5	13559 (11822-15166)	48,1	5527 (5290- 5764)	19,6
K 209	6569 (6124- 7014)	1	12187 (9114-16304)	1,9	16315 (13306-18452)	2,5	12636 (11004-14904)	1,9
B 209	9711 (8692-10730)	1	8209 (7450- 8626)	0,8	8090 (7100- 9204)	0,8	7074 (6356- 8438)	0,7
HA 209	6902 (6536- 8340)	1	7101 (5946- 8660)	1,0	8939 (7400-10720)	1,3	8668 (7422- 9254)	1,3
HB 209	8980 (6418-10708)	1	7859 (6990- 9084)	0,9	8987 (8468- 9978)	1,0	7108 (5016- 8552)	0,8
HL 209	7169 (5380- 9038)	1	10078 (8746-11756)	1,4	9552 (9180-10126)	1,3	11384 (10386-12022)	1,6
P 209	10545 (9826-11264)	1	10091 (8726-11322)	1,0	9277 (8604- 9898)	0,9	10404 (8274-11880)	1,0

Tabelle 12: Mitogen-Stimulation boviner PBL und Theileria annulata-befallener unbehandelter bzw. behandelter Kulturzellen.
Con A : Concanavalin A cpm : counts per minute
PHA : Phytohämagglutinin si : Stimulationsindex
PWM : Pokeweed-Mitogen
Bei den vorliegenden Werten handelt es sich um den aus 3 Einzelwerten bestehenden arithmetischen Mittelwert, in Klammern wurde der Bereich (niedrigster und höchster Einzelwert) angegeben.
*) Es lag nur ein Einzelwert vor.

	ohne Mitogen		Con A		PHA		PWM	
Zellen	cpm $\bar{x}$	si	cpm $\bar{x}$	si	cpm $\bar{x}$	si	cpm $\bar{x}$	si
PBL 85	147 (132- 170)	1	1321 (1196- 1552)	9,0	1586 (1120- 1978)	10,8	1986 (1460- 2678)	13,5
K 255	9669 (8788-10550)	1	14773 (13374-16774)	1,5	13754 (10110-16004)	1,4	12703 (10114-17104)	1,3
B 255	7045 (6370- 8094)	1	12002 (11524-12566)	1,7	10200 (7988-11216)	1,4	7205 (5966- 8896)	1,0
HA 255	8507 (6440-11080)	1	10750 (9246-11536)	1,3	8096 (8006- 9728)	1,0	7279 (6822- 8012)	0,9
HB 255	9288 (6792-11100)	1	12175 (11240-12854)	1,3	10213 (9960-12378)	1,1	9465 (8726-10202)	1,0
HL 255	9715 (8360-10998)	1	9257 (7430-10298)	1,0	9467 (7498-12374)	1,0	9743 (8366-11598)	1,0
P 255	6153 (5644- 6774)	1	7943 (7058- 8556)	1,3	6846 (6006- 7890)	1,1	6477 (5930- 7376)	1,1

Tabelle 13: Mitogen-Stimulation boviner PBL und Theileria annulata-befallener unbehandelter bzw. behandelter Kulturzellen.
Con A : Concanavalin A cpm : counts per minute
PHA : Phytohämagglutinin si : Stimulationsindex
PWM : Pokeweed-Mitogen
Bei den vorliegenden Werten handelt es sich um den aus 3 Einzelwerten bestehenden arithmetischen Mittelwert, in Klammern wurde der Bereich (niedrigster und höchster Einzelwert) angegeben.
*) Es lag nur ein Einzelwert vor.

3.2.4. E-, EA- und EAC-Rosettenbildung unbehandelter bzw. behandelter Theileria annulata-infizierter Kulturzellen

Für die Rosettenbildung wurden Rinder-PBL (2 x 10^6/ml) mit vorbereiteten Gebrauchssuspensionen gemischt und inkubiert. Die PBL zweier Kontrolltiere bildeten in vier verschiedenen Versuchen durchschnittlich 34,6% E-, 17,1% EA- und 22,8% EAC-Rosetten (Tab. 14, S. 53; Tab. 16, S. 55).
In zwei Versuchsreihen wurden die Erythrozytenkonzentrationen verändert. Wurde nur die halbe Menge der Erythrozytensuspension angewandt, bildeten 31,8% der Lymphozyten E-, 8,3% EA- und 19,8% EAC-Rosetten. Bei einem Viertel der Erythrozytenkonzentration sanken die E-Rosetten bildenden PBL auf 14,3%, die EA- auf 6,0% und die EAC- auf 10,5% (Tab. 16, S. 55).
Ein zu gleichen Teilen aus T. annulata-infizierten Kulturzellen und PBL bestehendes Gemisch bildete mit der normalen Erythrozytenmenge zu 36,3% E-, zu 6,0% EA- und zu 9,0% EAC-Rosetten, mit der halben Konzentration roter Blutkörperchen zu 16,8% E-, zu 5,5% EA- und zu 5,8% EAC-Rosetten und mit einem Viertel der Erythrozyten zu 7,5% E-, zu 2,3% EA- und zu 4,3% EAC-Rosetten.

Schließlich wurden nur mit T. annulata-infizierte Kulturzellen der Linien 209 und 210 mit den Rosettenkomplexen gemischt. Sowohl unter normalen Zellkonzentrationsverhältnissen als auch unter Verdoppelung der Kulturzellmenge bzw. unter Verwendung der Hälfte oder einem Viertel der Erythrozyten bewegten sich die Prozentsätze E-, EA- und EAC-Rosetten formender Zellen zwischen 0% und 2,3%.
Durch die Behandlung der Kulturzellen mit Bay g 7183, Halofuginonaceturat, -hydrobromid, -lactat und Parvaquone konnten die Prozentsätze der Rosetten bildenden Zellen nur in einzelnen Fällen um unwesentliche Beträge gesteigert werden (Tab. 14-16, S. 53-55).

Konzentration der Kulturzellen bzw. der PBL		2 x 10^6/ml	2 x 10^6/ml	2 x 10^6/ml
Kulturzellen Nr.		210	209	209
PBL Nr.		244	244	92
K	E	0	0	0
	EA	0,3 (0- 1)	0,5 (0 - 1,5)	0
	EAC	0,7 (0- 1)	2,0 (0 - 4)	0
B	E	1,7 (0- 3)	0,2 (0 - 0,5)	0,2 (0- 0,5)
	EA	1,0 (0- 2)	3,2 (1 - 7)	0,2 (0- 0,5)
	EAC	2,5 (1- 4)	2,4 (0 - 5,5)	0
HA	E	4,0 (2- 6)	0,2 (0 - 0,5)	1,2 (0- 3,5)
	EA	0,3 (0- 1)	4,2 (0,5- 7,5)	0
	EAC	6,7 (4-10)	4,0 (2,5- 5)	0
HB	E	4,0 (3- 5)	0,2 (0 - 0,5)	7,0 (6- 7,5)
	EA	7,3 (5-11)	2,0 (0 - 3,5)	0
	EAC	6,0 (1-10)	1,0 (1 - 1)	0
HL	E	3,0 (2- 5)	0	1,8 (1- 3,5)
	EA	7,0 (4-12)	4,2 (2 - 5,5)	0
	EAC	1,3 (0- 2)	1,3 (0 - 2,5)	0,2 (0-0,5)
P	E	1,0 (1- 1)	0	1,3 (0- 3)
	EA	4,3 (4- 5)	3,0 (2,5- 3,5)	0
	EAC	0	0,3 (0 - 0,5)	0
PBL	E	33,8 (28-38)	37,2 (36,5-38)	30,0 (23-37)
	EA	18,5 (14-27)	16,2 (13 -18)	17,0 (15-20)
	EAC	30,5 (17-41,5)	22,7 (20 -27,5)	19,6 (13-23)

Tabelle 14: Prozentsatz Rosetten-bildender Zellen bei nichtinfizierten PBL und bei behandelten und unbehandelten Theileria annulata-infizierten Kulturzellen
E : E -Rosettenkomplexsuspension
EA : EA -Rosettenkomplexsuspension
EAC : EAC-Rosettenkomplexsuspension
Bei den vorliegenden Werten handelt es sich um den aus drei Einzelwerten bestehenden arithmetischen Mittelwert, in Klammern wurde der Bereich (niedrigster und höchster Einzelwert) angegeben.

Konzentration der Kulturzellen bzw. der PBL		4×10^6 / ml	4×10^6 / ml
Kulturzellen Nr.		210	210
PBL	Nr.	92	92
K	E	0	0,2 (0-0,5)
	EA	2,3 (0 -3)	0
	EAC	2,3 (0 -3,5)	0
B	E	0,3 (0 -0,5)	0
	EA	0,5 (0,5-0,5)	0
	EAC	0,5 (0 -1)	0
HA	E	1,8 (1 -2,5)	0
	EA	2,3 (1,5-3)	0
	EAC	2,5 (2 -3)	0
HB	E	0,5 (0 -1)	0
	EA	2,0 (1,5-2,5)	0
	EAC	3,0 (2 -4)	0
HL	E	0	0
	EA	2,5 (2 -3)	0
	EAC	3,8 (3,5-4)	0
P	E	0	0
	EA	1,5 (0,5-2,5)	0
	EAC	2,0 (1,5-2,5)	0
PBL	E	59,0 (55-63)	59,5 (55,5-64)
	EA	8,3 (7,5- 9)	4,7 (2 - 7)
	EAC	15,0 (14,5-15,5)	13,0 (12,5-13,5)

Tabelle 15: Prozentsatz Rosetten-bildender Zellen bei nichtinfizierten PBL und bei behandelten und unbehandelten Theileria annulata-infizierten Kulturzellen
E : E -Rosettenkomplexsuspension
EA : EA -Rosettenkomplexsuspension
EAC : EAC-Rosettenkomplexsuspension
Bei den vorliegenden Werten handelt es sich um den aus drei Einzelwerten bestehenden arithmetischen Mittelwert, in Klammern wurde der Bereich (niedrigster und höchster Einzelwert) angegeben.

Konzentration der Rosettenkomplex-gebrauchssuspension		1	1/2	1/4
Kulturzellen Nr.		209	209	209
PBL Nr.		92	92	92
K	E	0,5 (0-1)	0	0
	EA	0	0	0
	EAC	0	0	0
B	E	0,7 (0-1,5)	0	0
	EA	0,2 (0-0,5)	0	0
	EAC	0	0	0
HA	E	1,2 (0-3)	0	0
	EA	0,5 (0-1)	0	0
	EAC	0	0	0
HB	E	2,0 (1-4)	0	0
	EA	0,	0	0
	EAC	0,5 (0-1)	0	0
HL	E	1,3 (0-2,5)	0	0
	EA	0,2 (0-0,5)	0	0
	EAC	0	0	0
P	E	0	0	0
	EA	0	0	0
	EAC	0	0	0
PBL	E	37,3 (33,5-41)	31,8 (30 -35)	14,3 (13 -16,5)
	EA	16,5 (14 -19,5)	8,3 (8 - 9)	6,0 (6 - 6)
	EAC	18,5 (18,5-18,5)	19,8 (19 -21)	10,5 (9 -12))
K+PBL	E	36,3 (35 -38)	16,8 (14,5-19)	7,5 (7,5- 7,5)
	EA	6,0 (5 - 6,5)	5,5 (4,5- 6)	2,3 (2 - 3)
	EAC	9,0 (8,5- 9,5)	5,8 (5 - 6,5)	4,3 (4 - 4,5)

Tabelle 16: Prozentsatz Rosetten-bildender Zellen bei nichtinfizierten PBL und bei behandelten und unbehandelten Theileria annulata-infizierten Kulturzellen
E : E -Rosettenkomplexsuspension
EA : EA -Rosettenkomplexsuspension
EAC : EAC-Rosettenkomplexsuspension
Bei den vorliegenden Werten handelt es sich um den aus drei Einzelwerten bestehenden arithmetischen Mittelwert, in Klammern wurde der Bereich (niedrigster und höchster Einzelwert) angegeben.

Anhang zu 3.2.1 und 3.2.2.

Schizontenindices in % vor bzw. nach der Behandlung								
	mit Hilfe der Giemsa-färbung bestimmt				Mit Hilfe des Immun-fluoreszenztestes ermittelt			
	209	S	210	S	209	S	210	S
K	84		89		88		93	
B	74	12	74	17	82	7	83	11
HA	49	42	66	26	59	33	76	18
HB	69	18	68	24	75	15	82	12
HL	57	32	63	28	58	34	66	29
P	48	43	61	31	61	31	77	17

Tabelle 1: Einfluß der Chemotherapeutika auf den Schizontenindex T. annulata-befallener Kulturzellen.
S = Senkung des Schizontenindex um x%.

	Kulturzellen	Schizontenpartikelanzahl (Giemsa-Färbung) pro Zelle		
		1 - 5	6 - 10	11 - oo
a)	K 209	15,5%	36,0%	48,5%
	B 209	22,0%	49,0%	29,0%
	HA 209	50,0%	46,0%	4,0%
	HB 209	50,0%	40,0%	10,0%
	HL 209	58,0%	36,0%	6,0%
	P 209	80,0%	12,0%	8,0%
b)	K 209	15,0%	35,0%	50,0%
	B 209	27,0%	32,0%	41,0%
	HA 209	48,0%	33,0%	19,0%
	HB 209	22,0%	34,0%	44,0%
	HL 209	40,0%	38,0%	22,0%
	P 209	31,0%	52,0%	17,0%
c)	K 209	12,0%	38,0%	50,0%
	B 209	19,5%	32,5%	48,0%
	HA 209	68,0%	24,0%	8,0%
	HB 209	37,0%	51,0%	12,0%
	HL 209	62,0%	34,0%	4,0%
	P 209	56,0%	40,0%	4,0%
d)	K 210	18,0%	31,5%	50,5%
	B 210	34,0%	29,5%	36,5%
	HA 210	54,0%	31,0%	15,0%
	HB 210	42,0%	32,5%	25,5%
	HL 210	47,0%	30,5%	22,5%
	P 210	65,0%	29,0%	6,0%

Tabelle 2: Einfluß der Chemotherapeutika auf die Anzahl der Schizontenpartikel T. annulata-befallener Kulturzellen.

	K	B	HA	HB	HL	P
lebende Zelle + lebender Schizont	74%	76%	38%	32%	53%	34%
lebende Zelle + toter Schizont	6%	3%	40%	33%	24%	38%
tote Zelle + toter Schizont	20%	14%	15%	32%	18%	22%
tote Zelle + lebender Schizont	-	7%	7%	3%	5%	6%

Tabelle 3: Lebend-Tot-Verhältnisse T. annulata-befallener Kulturzellen (Färbung mit Ethidium-Bromid und Acridin-Orange).

Zellkombination		cpm $\bar{x}$		si
a)	K 209 m + Medium	1030	(1024-1036)	-
	B 209 m + Medium	196	(148- 258)	-
	PBL 1 + Medium	1023	(476-1636)	-
	PBL 1 + K 209 m	6209	(5340- 7808)	5,1
	PBL 1 + B 209 m	2691	(2540- 2902)	2,4
b)	K 209 m + Medium	549	(412- 630)	-
	B 209 m + Medium	581	(424- 744)	-
	PBL 1 + Medium	964	(709- 1112)	-
	PBL 1 + K 209 m	3117	(2460- 4180)	2,7
	PBL 1 + B 209 m	2851	(2538- 3436)	2,4
c)	K 209 m + Medium	549	(412- 630)	-
	B 209 m + Medium	581	(424- 744)	-
	PBL 7 + Medium	400	(308- 502)	-
	PBL 7 + K 209 m	9211	(8498- 9924)	21,7
	PBL 7 + B 209 m	8151	(6752-10054)	18,9
d)	K 209 m + Medium	234	(124- 344)	-
	B 209 m + Medium	433	(346- 490)	-
	PBL 7 + Medium	715	(488- 1132)	-
	PBL 7 + K 209 m	8528	(8180- 9176)	11,6
	PBL 7 + B 209 m	7088	(5868- 8924)	9,3
e)	K 209 m + Medium	223	(150- 284)	-
	B 209 m + Medium	194	(126- 244)	-
	PBL 210 + Medium	265	*)	-
	PBL 210 + K 209 m	15352	(14446-16602)	59,1
	PBL 210 + B 209 m	13224	(11938-14026)	50,9

Tabelle 4: ^{3}H-Thymidineinbau von Lymphozyten nicht infizierter Kälber nach Stimulation mit T. annulata-befallenen unbehandelten und mit Bay g 7183 behandelten Kulturlymphoblasten.

Stimulator : 2,5 x 10^5 Zellen/ml
Responder : 2,5 x 10^6 Zellen/ml
Inkubationszeit: 144 Stunden
m : Mitomycin C-behandelt
cpm : counts per minute
si : Stimulationsindex
Bei den vorliegenden Werten handelt es sich um den aus drei Einzelwerten bestehenden arithmetischen Mittelwert, in Klammern wurde der Bereich (niedrigster und höchster Einzelwert) angegeben.
*) Es lag nur ein Einzelwert vor.

	Zellkombination	cpm x̄		si
a)	K 209 m + Medium	549	(412- 630)	-
	HA 209 m + Medium	490	(392- 592)	-
	PBL 1 + Medium	964	(708- 1112)	-
	PBL 1 + K 209 m	3117	(2460- 4180)	2,7
	PBL 1 + HA 209 m	4402	(3402- 5158)	4,1
b)	K 209 m + Medium	549	(412- 630)	-
	HA 209 m + Medium	490	(392- 592)	-
	PBL 7 + Medium	400	(308- 502)	-
	PBL 7 + K 209 m	9211	(8498- 9924)	21,7
	PBL 7 + HA 209 m	15310	(13338-17422)	37,1
c)	K 209 m + Medium	1030	(1024- 1036)	-
	HA 209 m + Medium	172	(118- 226)	-
	PBL 7 + Medium	474	(392- 548)	-
	PBL 7 + K 209 m	9987	(7846-12702)	18,9
	PBL 7 + HA 209 m	12901	(10436-15198)	26,9
d)	K 209 m + Medium	565	(466- 642)	-
	HA 209 m + Medium	382	(350- 434)	-
	PBL 209 + Medium	2632	(2206- 3058)	-
	PBL 209 + K 209 m	13777	(13612-13942)	5,0
	PBL 209 + HA 209 m	15830	*)	5,9
e)	K 209 m + Medium	565	(466- 642)	-
	HA 209 m + Medium	382	(350- 434)	-
	PBL 210 + Medium	458	(286- 548)	-
	PBL 210 + K 209 m	15077	(12330-17314)	31,7
	PBL 210 + HA 209 m	17631	(16418-18940)	37,7

Tabelle 5a: ^{3}H-Thymidineinbau von Lymphozyten nicht infizierter Kälber nach Stimulation mit T. annulata-befallenen unbehandelten und mit Halofuginonaceturat behandelten Kulturlymphoblasten
Stimulator: 2,5 x 10^{5} Zellen/ml
Responder : 2,5 x 10^{6} Zellen/ml
Inkubationszeit: 144 Stunden
m : Mitomycin C-behandelt
cpm : counts per minute
si : Stimulationsindex
Bei den vorliegenden Werten handelt es sich um den aus drei Einzelwerten bestehenden arithmetischen Mittelwert, in Klammern wurde der Bereich (niedrigster und höchster Einzelwert) angegeben.
*) Es lag nur ein Einzelwert vor.

	Zellkombination	cpm $\bar{x}$		si
f)	K 210 m + Medium	561	(506- 598)	-
	HA 210 m + Medium	593	(578- 604)	-
	PBL 1 + Medium	623	(510- 770)	-
	PBL 1 + K 210 m	2615	(2416- 2856)	3,3
	PBL 1 + Ha 210 m	2825	(2356- 3534)	3,6
g)	K 210 m + Medium	212	(148- 284)	-
	HA 210 m + Medium	1263	(976- 1422)	-
	PBL 7 + Medium	308	(252- 416)	-
	PBL 7 + K 210 m	3068	(2514- 3352)	9,3
	PBL 7 + HA 210 m	3391	(2642- 4030)	6,9
h)	K 210 m + Medium	280	*)	-
	HA 210 m + Medium	268	*)	-
	PBL 209 + Medium	206	(114- 298)	-
	PBL 209 + K 210 m	18609	(15514-22008)	89,0
	PBL 209 + HA 210 m	17762	(13902-21622)	84,9
i)	K 210 m + Medium	280	*)	-
	HA 210 m + Medium	268	*)	-
	PBL 210 + Medium	198	(162- 234)	-
	PBL 210 + K 210 m	16510	(15720-17018)	82,0
	PBL 210 + HA 210 m	16383	(15028-18886)	81,4

Tabelle 5b: ^{3}H-Thymidineinbau von Lymphozyten nicht infizierter Kälber nach Stimulation mit T. annulata-befallenen unbehandelten und mit Halofuginonaceturat behandelten Kulturlymphoblasten
Stimulator: 2,5 x 10^5 Zellen/ml
Responder : 2,5 x 10^6 Zellen/ml
Inkubationszeit: 144 Stunden
m : Mitomycin C-behandelt
cpm : counts per minute
si : Stimulationsindex
Bei den vorliegenden Werten handelt es sich um den aus drei Einzelwerten bestehenden arithmetischen Mittelwert, in Klammern wurde der Bereich (niedrigster und höchster Einzelwert) angegeben.
*) Es lag nur ein Einzelwert vor.

	Zellkombination	cpm $\bar{x}$		si
a)	K 209 m + Medium	1030	(1024- 1036)	-
	HB 209 m + Medium	1057	(516- 1354)	-
	PBL 1 + Medium	1023	(476- 1636)	-
	PBL 1 + K 209 m	6209	(5340- 7808)	5,1
	PBL 1 + HB 209 m	4885	(3082- 6944)	3,7
b)	K 209 m + Medium	549	(412- 630)	-
	HB 209 m + Medium	506	(456- 558)	-
	PBL 1 + Medium	964	(709- 1112)	-
	PBL 1 + K 209 m	3117	(2460- 4180)	2,7
	PBL 1 + HB 209 m	5275	(3936- 7802)	4,9
c)	K 209 m + Medium	549	(412- 630)	-
	HB 209 m + Medium	506	(456- 558)	-
	PBL 7 + Medium	400	(308- 502)	-
	PBL 7 + K 209 m	9211	(8498- 9924)	21,7
	PBL 7 + HB 209 m	13208	(11518-16032)	31,8
d)	K 209 m + Medium	565	(466- 642)	-
	HB 209 m + Medium	451	(414- 488)	-
	PBL 209 + Medium	2632	(2206- 3058)	-
	PBL 209 + K 209 m	13777	(13612-13942)	5,0
	PBL 209 + HB 209 m	14975	(13402-15806)	5,5
e)	K 209 m + Medium	222	(150- 284)	-
	HB 209 m + Medium	1303	(1196- 1422)	-
	PBL 209 + Medium	276	*)	-
	PBL 209 + K 209 m	15147	(14750-15366)	54,1
	PBL 209 + HB 209 m	12065	(12032-14068)	39,0
f)	K 209 m + Medium	223	(150- 284)	-
	HB 209 m + Medium	1303	(1196- 1422)	-
	PBL 210 + Medium	265	*)	-
	PBL 210 + K 209 m	15352	(14446-16802)	57,1
	PBL 210 + HB 209 m	14971	(14024-16686)	51,6

Tabelle 6a: ^{3}H-Thymidineinbau von Lymphozyten nicht infizierter Kälber nach Stimulation mit T. annulata-befallenen unbehandelten und mit Halofuginonhydrobromid behandelten Kulturlymphoblasten.
Stimulator: $2{,}5 \times 10^{5}$ Zellen/ml
Responder : $2{,}5 \times 10^{6}$ Zellen/ml
Inkubationszeit: 144 Stunden
m : Mitomycin C-behandelt
cpm : counts per minute
si : Stimulationsindex
Bei den vorliegenden Werten handelt es sich um den aus drei Einzelwerten bestehenden arithmetischen Mittelwert, in Klammern wurde der Bereich (niedrigster und höchster Einzelwert) angegeben.
*) Es lag nur ein Einzelwert vor.

	Zellkombination	cpm $\bar{x}$		si
g)	K 210 m + Medium	561	(506- 598)	-
	HB 210 m + Medium	669	(600 - 724)	-
	PBL 1 + Medium	623	(510 - 770)	-
	PBL 1 + K 210 m	2615	(2416- 2856)	3,3
	PBL 1 + HB 210 m	2528	(1692- 3336)	3,0

Tabelle 6b: ^{3}H-Thymidineinbau von Lymphozyten nicht infizierter Kälber nach Stimulation mit T. annulata-befallenen unbehandelten und mit Halofuginonhydrobromid behandelten Kulturlymphoblasten.
Stimulator: 2,5 x 10^{5} Zellen/ml
Responder : 2,5 x 10^{6} Zellen/ml
Inkubationszeit: 144 Stunden
m : Mitomycin C-behandelt
cpm : counts per minute
si : Stimulationsindex
Bei den vorliegenden Werten handelt es sich um den aus drei Einzelwerten bestehenden arithmetischen Mittelwert, in Klammern wurde der Bereich (niedrigster und höchster Einzelwert) angegeben.

	Zellkombination	cpm $\bar{x}$		si
a)	K 209 m + Medium	549	(412- 630)	-
	HL 209 m + Medium	549	(546 - 552)	-
	PBL 1 + Medium	964	(709- 1112)	-
	PBL 1 + K 209 m	3117	(2460- 4180)	2,7
	PBL 1 + HL 209 m	3397	(3202- 3774)	3,0
b)	K 209 m + Medium	1030	(1024- 1036)	-
	HL 209 m + Medium	369	(226- 602)	-
	PBL 1 + Medium	1023	(476- 1636)	-
	PBL 1 + K 209 m	6209	(5340- 7808)	5,1
	PBL 1 + HL 209 m	8411	(6788-10426)	7,9
c)	K 209 m + Medium	1030	(1024- 1036)	-
	HL 209 m + Medium	369	(226- 602)	-
	PBL 7 + Medium	474	(392- 548)	-
	PBL 7 + K 209 m	9987	(7846-12702)	18,9
	PBL 7 + HL 209 m	8722	(7330-10492)	17,6
d)	K 209 m + Medium	222	(150- 284)	-
	HL 209 m + Medium	4231	(2978- 4946)	-
	PBL 209 + Medium	276	*)	-
	PBL 209 + K 209 m	15147	(14750-15366)	54,1
	PBL 209 + HL 209 m	14514	(14242-14786)	37,3
e)	K 210 m + Medium	561	(506- 598)	-
	HL 210 m + Medium	689	(624- 804)	-
	PBL 1 + Medium	623	(510- 770)	-
	PBL 1 + K 210 m	2615	(2416- 2856)	3,3
	PBL 1 + HL 210 m	2379	(2040- 2810)	2,7
f)	K 210 m + Medium	561	(506- 598)	-
	HL 210 m + Medium	689	(624- 804)	-
	PBL 7 + Medium	623	(308- 502)	-
	PBL 7 + K 210 m	11714	(9734-13226)	27,6
	PBL 7 + HL 210 m	7574	(5348-10898)	17,2

Tabelle 7: ^{3}H-Thymidineinbau von Lymphozyten nicht infizierter Kälber nach Stimulation mit T. annulata-befallenen unbehandelten und mit Halofuginonlactat behandelten Kulturlymphoblasten.
Stimulator: $2,5 \times 10^{5}$ Zellen/ml
Responder : $2,5 \times 10^{6}$ Zellen/ml
Inkubationszeit: 144 Stunden
m : Mitomycin C-behandelt
cpm : counts per minute
si : Stimulationsindex
Bei den vorliegenden Werten handelt es sich um den aus drei Einzelwerten bestehenden arithmetischen Mittelwert, in Klammern wurde der Bereich (niedrigster und höchster Einzelwert) angegeben.
*) Es lag nur ein Einzelwert vor.

	Zellkombination	cpm $\bar{x}$		si
a)	K 209 m + Medium	549	(412- 630)	-
	P 209 m + Medium	284	(200- 344)	-
	PBL 1 + Medium	964	(709- 1112)	-
	PBL 1 + K 209 m	3117	(2460- 4180)	2,7
	PBL 1 + P 209 m	4147	(3762- 4612)	4,0
b)	K 209 m + Medium	549	(412- 630)	-
	P 209 m + Medium	284	(200- 344)	-
	PBL 7 + Medium	400	(308- 502)	-
	PBL 7 + K 209 m	9211	(8498- 9924)	21,7
	PBL 7 + P 209 m	11786	(10048-13304)	28,8
c)	K 209 m + Medium	222	(150- 284)	-
	P 209 m + Medium	542	(438- 720)	-
	PBL 209 + Medium	276	*) -	
	PBL 209 + K 209 m	15147	(14750-15366)	54,1
	PBL 209 + P 209 m	15489	(14116-17946)	54,2
d)	K 209 m + Medium	222	(150- 284)	-
	P 209 m + Medium	542	(438 - 720)	-
	PBL 210 + Medium	265	*)	-
	PBL 210 + K 209 m	15352	(14446-16602)	57,1
	PBL 210 + P 209 m	19919	(19134-20928)	73,1
e)	K 210 m + Medium	561	(506- 598)	-
	P 210 m + Medium	470	(438- 522)	-
	PBL 1 + Medium	623	(510- 770)	-
	PBL 1 + K 210 m	2615	(2416- 2856)	3,3
	PBL 1 + P 210 m	2116	(1642- 2780)	2,6
f)	K 210 m + Medium	561	(506- 598)	-
	P 210 m + Medium	470	(438- 522)	-
	PBL 7 + Medium	400	(308- 502)	-
	PBL 7 + K 210 m	11714	(9734-13226)	27,9
	PBL 7 + P 210 m	7531	(5602- 9094)	17,7

Tabelle 8: ^{3}H-Thymidineinbau von Lymphozyten nicht infizierter Kälber nach Stimulation mit T. annulata-befallenen unbehandelten und mit Parvaquone behandelten Kulturlymphoblasten.
Stimulator: 2,5 x 10^5 Zellen/ml
Responder : 2,5 x 10^6 Zellen/ml
Inkubationszeit: 144 Stunden
m : Mitomycin C-behandelt
cpm : counts per minute
si : Stimulationsindex
Bei den vorliegenden Werten handelt es sich um den aus drei Einzelwerten bestehenden arithmetischen Mittelwert, in Klammern wurde der Bereich (niedrigster und höchster Einzelwert) angegeben.
*) Es lag nur ein Einzelwert vor.

4. Besprechung der Ergebnisse

Um den Einfluß der Präparate Bay g 7183, Halofuginonaceturat, -hydrobromid, -lactat und Parvaquone auf die Morphologie und die Funktion T. annulata-befallener Zellen besser beurteilen zu können, wurden zunächst der Schizontenindex, die Anzahl der Schizontenpartikel und die Vitalität von Schizont und Wirtszelle bestimmt.

Anfangs waren in dieser Arbeit die Schizontenindices nichttherapierter und therapierter T. annulata-infizierter Lymphoblasten mit Hilfe der Giemsafärbung bestimmt worden. Sie entsprachen den von KOHLMEYER (1983) ermittelten Prozentsätzen. Die mit dem indirekten Immunfluoreszenztest erzielten Ergebnisse zeigten dagegen sowohl bei den unbehandelten als auch bei den behandelten Lymphoblasten einen höheren Anteil befallener Zellen als bei der Giemsafärbung. Durch den indirekten Immunfluoreszenztest konnten also offenbar noch Reste des Schizontenantigens sichtbar gemacht werden, die zwar durch die Giemsafärbung nicht mehr erkannt werden, aber mit den Antikörpern im Immunfluoreszenztest noch reagieren konnten (Fig. 1, S. 36; Tab. 1, S. 56).

Die Auszählung der Schizontenpartikel bestätigte die Vermutung von KOHLMEYER (1983), daß die angewandten Chemotherapeutika, mit Ausnahme von Bay g 7183, schizontozid wirken. Denn nach der Behandlung der Zellen mit Bay g 7183 hatte sich die Anzahl der Schizontenpartikel nur geringfügig geändert, während die vier anderen Chemotherapeutika eine deutliche Reduktion der Schizontenpartikelanzahl hervorgerufen hatten (Fig. 2, S. 37; Tab. 2, S. 57). Die äußerst schizontenspezifische Wirkung des Parvaquone war bereits von McHARDY (1979) an T. parva-infizierten Zellen nachgewiesen worden.

Mit Hilfe der Fluoreszenzfärbung war eindeutig zu erkennen, daß nach der medikamentellen Behandlung der befallenen Kultur-

zellen die Schizonten früher abstarben als ihre Wirtszellen. Denn nach der Therapie hatte sich die Zahl der lebenden Lymphoblasten, die tote Schizonten enthielten, deutlich erhöht. Allerdings kristallisierten sich auch in diesem Versuch wieder die Bay g 7183-behandelten Zellen als Ausnahme heraus, da die Lebend-Tot-Verhältnisse sich im Vergleich zu denen der befallenen Kontrollzellen nur unwesentlich verschoben (Fig. 3, S. 38; Tab. 3, S. 58).

Lebende T. annulata-infizierte Kulturzellen konnten im Rahmen dieser Arbeit sowohl autologe als auch allogene, nichtinfizierte PBL zur Transformation und Proliferation anregen. Ähnliche Ergebnisse waren bereits in MLR's gewonnen worden, die mit T. parva-infizierten Lymphozyten (PEARSON et al., 1979a; EMERY und MORRISON, 1980), mit Babesia equi-transformierten Zellen (ZWEYGARTH et al., 1983) und mit T. annulata-befallenen Lymphoblasten (FRESE, 1983) durchgeführt worden waren. Wie bei PEARSON et al. (1979a) und bei FRESE (1983) ließen sich in den hier beschriebenen Versuchen die PBL deutlich stärker durch die Theilerien-infizierten Kulturzellen als durch allogene PBL zur Proliferation anregen.
Folglich müssen in der MLR mit den T. annulata-infizierten Zellen außer den Histokompatibilitätsantigenen, die den durch die I-Region codierten des MHC entsprechen, ein oder mehrere weitere Faktoren die starke Proliferation autologer und allogener PBL induziert haben.
Stoffwechselprodukte T. parva- oder T. annulata-infizierter Kulturzellen, freie T. parva-Makroschizonten und Hitze-inaktivierte T. parva-befallene Kulturzellen sind zu keiner Stimulation peripherer Blutlymphozyten in der Lage (PEARSON et al. 1979a; FRESE, 1983).
Der PBL-stimulierende Faktor kann also nur noch in oder auf den lebenden Theilerien-befallenen Zellen gesucht werden.

PEARSON et al. (1979a) behandelten T. parva-transformierte Lymphoblasten mit Parvaquone, um die Kulturzellen von ihren Erregern zu befreien. Allerdings machten die Autoren keine

Angaben darüber, wie weit der Schizontenindex der Zellen nach der Parvaquone-Therapie gesunken war, und verließen sich auf die von McHARDY (1979) beschriebene Wirkungsweise des Chemotherapeutikums, der von einem Rückgang des Schizontenindex auf 15% nach einer 48-stündigen Therapie mit 1 µg/ml Parvaquone berichtete.
Im Rahmen dieser Arbeit wurden nun T. annulata-Schizonten tragende Lymphozyten ebenfalls mit 1 µg/ml Parvaquone 72 Stunden lang inkubiert. Dabei sank der Schizontenindex Giemsa-gefärbter Kulturzellen maximal auf 48%. Die Anwendung des indirekten Immunfluoreszenztestes bewies, daß in Wirklichkeit noch ein sehr viel größerer Anteil der Zellen nach der Behandlung Schizontenbestandteile beinhaltete (Fig. 1, S. 36; Tab. 1, S. 56).

Der Einfluß der Höhe des Schizontenindex auf die PBL-stimulierende Fähigkeit der Kulturzellen wird in der Literatur unterschiedlich beurteilt.
Während PEARSON et al. (1979a) bei der Inkubation T. parva-infizierter Kulturzellen mit autologen bzw. allogenen PBL eine positive MLR erreichten, konnten sie die autologen PBL mit Parvaquone-therapierten Kulturzellen nicht mehr stimulieren. Deshalb folgerten PEARSON et al. (1979a), daß sich auf der Oberfläche Theilerien-infizierter Zellen Parasiten-assoziierte Antigene befänden, die eine Stimulation nichtinfizierter autologer PBL bewirkten. Die Ausbildung eines Parasiten-abhängigen Antigens auf der Oberfläche eines Theilerien-infizierten Lymphoblasten stellten PINDER et al. (1981) dagegen in Frage. Denn trotz einer Behandlung der T. parva-befallenen Lymphozyten und einem Rückgang des Schizontenindex um 90 - 97% waren die Kulturzellen in PINDER's et al. (1981) Versuchen weiterhin in der Lage, autologe PBL zu einer starken Stimulation anzuregen. Entgegen PEARSON et al. (1979a) erklärten PINDER et al. (1981), daß auch schizonten-eliminierte Zellen ihre stimulierende Fähigkeit behielten.

In meinen Versuchen waren T. annulata-befallene Lymphozyten einerseits mit dem schizontostatisch wirkenden Chemotherapeutikum Bay g 7183 und andererseits mit den schizontozid wirkenden Substanzen Halofuginonaceturat, -hydrobromid, -lactat und Parvaquone behandelt worden. Hierbei zeigte sich, daß der Einfluß aller fünf Chemotherapeutika, trotz ihrer unterschiedlichen Wirkungsweise auf die Schizonten, auf die PBL-stimulierende Fähigkeit der Blastzellen gleichblieb. Denn keine der angewandten Substanzen schränkte die Eigenschaften der T. annulata-befallenen Lymphoblasten ein, autologe und allogene PBL zur Teilung anzuregen. Entgegen PEARSON's et al. (1979a) Meinung, aber gemäß PINDER's et al. (1981) Auffassung scheint es für die stimulierende Wirkung der Kulturzellen unbedeutend zu sein, ob die Lymphozyten zu 85% mit Schizonten befallen sind oder der Schizontenindex auf 48% gesenkt worden war. Bisher war es nicht gelungen, medikamentell alle befallenen Kulturzellen völlig von den Schizontenpartikeln zu befreien bzw. die befreiten Kulturzellen von den noch Parasitenbestandteile-enthaltenden Zellen zu trennen. Deshalb kann auch keine endgültige Aussage darüber gemacht werden, ob die ehemals Schizontenpartikel-enthaltenden, aber völlig befreiten Zellen ebenfalls noch eine stimulierende Wirkung auf autologe und allogene PBL besitzen.

Denkbar wäre es, daß einige PBL von ihren Stimulatoren Signale empfangen hatten, ebenfalls andere autologe PBL zur verstärkten Proliferation anzuregen. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden T. annulata-infizierte, vom Kalb Nr. 210 stammende und mit Mitomycin C versehene, therapierte bzw. nichttherapierte Zellen mit PBL des Kalbes Nr. 1 inkubiert. Nach fünf Tagen wurde dieses Zellgemisch erneut mit Mitomycin C versehen und mit frischen PBL des Rindes Nr. 1 bebrütet. Hierbei erfolgte keine Proliferation. Die PBL hatten also nicht die Eigenschaften der Kulturzellen übernommen, autologe Lymphozyten zu stimulieren. Blutlymphozyten eines dritten Kalbes ließen sich hingegen, sicherlich aufgrund der unterschiedlichen Histokompatibilitätsantigene, zu einer geringfügig gesteigerten Teilung anregen.

Folglich ist es also wahrscheinlicher, daß sich durch die Infektion mit T. annulata auf der Oberfläche der Lymphozyten Antigene gebildet haben, die auch nach der Eliminierung der Schizonten weiterhin Bestand haben und für die PBL-Stimulation verantwortlich sind. Zu klären bliebe allerdings, wie diese Antigene morphologisch auf der Zelloberfläche angeordnet sein können und wie die PBL die Stimulationsantigene erkennen können.
Als Antwort auf diese Frage bieten sich zwei Hypothesen über die Anordnung der Antigene auf den Oberflächen Virus-infizierter Lymphozyten bzw. die Lokalisierung der Rezeptoren auf den als Effektoren wirkenden T-Lymphozyten an, das Dual-Recognition- und das Altered-Self-Modell (LANGMANN, 1978; ZINKERNAGEL, 1978, 1979; ZINKERNAGEL und DOHERTY, 1979; HAHN und KAUFMANN, 1981).
Nach dem Dual-Recognition-Modell könnte sich unabhängig vom MHC-Produkt ein Fremdantigen auf der Oberfläche der Stimulatorzelle ausgebildet haben. Von den Respondern müßten dann sowohl das MHC-Produkt als auch das Fremdantigen mit Hilfe zweier spezifischer Rezeptoren erkannt werden. Gemäß dem Altered-Self-Modell könnten das MHC-Produkt und das Fremdantigen einen Komplex auf der Stimulatoroberfläche bilden, der als neue Antigendeterminante von einem einzigen Rezeptor der Responderzelle erfaßt wird.

Ein weiterer Parameter zur Charakterisierung behandelter und unbehandelter T. annulata-befallener Kulturzellen war die Stimulierbarkeit durch die Mitogene Con A, PHA und PWM. Die Kulturzellen waren bereits durch den Erreger zu einer verstärkten Proliferation angeregt und in ein Mitose-aktives Stadium überführt worden und konnten deshalb nicht noch zusätzlich durch Mitogene stimuliert, d.h. zu einer noch rascheren Teilung veranlaßt werden. Auch PINDER et al. (1981) und FRESE (1983) hatten das gleiche Phänomen an T. parva- bzw. T. annulata-infizierten Zellen beobachtet.
In meinen Versuchen wurden die T. annulata-befallenen Zellen nun mit Bay g 7183, Halofuginonaceturat, -hydrobromid, -lactat

und Parvaquone behandelt und wiederum mit den Mitogenen inkubiert. Die Ergebnisse zeigten, daß weder die cpm-Grundwerte noch die Stimulationsindices wesentlich von denen der unbehandelten Kulturzellen abwichen. Die Blastzellen waren also durch die Chemotherapie nicht in ihrer Aktivität unterdrückt worden.

Um die T. annulata-befallenen Kulturzellen vor und nach dem Einfluß der Chemotherapeutika genauer differenzieren zu können, wurden sie auch auf ihre Fähigkeit, E-, EA- und EAC-Rosetten zu bilden untersucht. Durchschnittlich bildeten PBL nicht infizierter Kontrollrinder 34,6% spontane Rosetten. Dieser Wert liegt ungefähr im Bereich der von FRUCHTMANN et al. (1977), REEVES und RENSHAW (1978) und REHBEIN et al. (1981a) ermittelten Ergebnisse.
Ebenso lagen die im Rahmen meiner Versuche bestimmten durchschnittlichen 22,8% EAC-Rosetten-bildenden Rinderlymphozyten im Bereich der von GARCIA DE LIMA und MITSCHERLICH (1973) sowie HIGGINS und STACK (1978) angegebenen Werte.
Die Fc-Rezeptoren besitzenden Zellen lagen mit durchschnittlich 17,1% etwas unter den von REEVES und RENSHAW (1978) und REHBEIN et al. (1981a) angegebenen Zahlen.
In vitro mit T. annulata-Sporozoiten infizierte PBL konnten ca. 30 Tage post infectionem keine E-, EA- und EAC-Rosetten mehr bilden. Auch unter Verwendung der doppelten Kulturzellkonzentration bzw. der Hälfte oder einem Viertel der Erythrozytensuspension blieb die Rosettenbildung aus.
Durch die Infektion und die Transformation zur Mitose-aktiven Blastoidzelle hatten die Zellen sowohl die für T-Lymphozyten charakteristischen Rezeptoren für die heterologen Erythrozyten, als auch die für B-Lymphozyten charakteristischen Rezeptoren für Komplementkomponenten bzw. die Rezeptoren für den Fc-Teil des IgG-Moleküls verloren.
Nach einer Behandlung der befallenen Kulturzellen mit Bay g 7183, Halofuginonaceturat, -hydrobromid, -lactat und Parvaquone konnten die Kulturzellen ebenfalls keine Rosetten mehr bilden.

Da durch die Therapie mit den Schizontoziden aber nur ein Teil der Kulturzellen vom Schizonten befreit und dadurch eventuell in den Rosetten-bildenden Zustand zurückgeführt worden war, erhöhte ich den Anteil der behandelten Zellen bzw. senkte die Erythrozytenkonzentration, um durch die Änderung des Konzentrationsverhältnisses den vom Schizonten befreiten Zellen eine Chance zur Rosettierung zu bieten. Auch nach Verwendung der doppelten Kulturzellmenge bzw. der halben oder eines Viertels der Erythrozytenkonzentration waren die behandelten Kulturzellen nicht fähig, Erythrozyten anzulagern. Die Kulturzellen ließen sich also offensichtlich nicht durch die Chemotherapie, d.h. durch Eliminierung der Schizonten in den Rosetten-bildenden Zustand zurückführen. Die Zellen gewannen also auch nach der Therapie nicht ihre ursprünglich vorhandenen, durch den Theilerien-Befall verlorenen Oberflächenrezeptoren zurück.

5. Zusammenfassung

Der Einfluß fünf verschiedener Chemotherapeutika auf Theileria (T.) annulata-befallene Rinderlymphoblastoidzellen wurde in vitro untersucht. Mit folgenden Chemotherapeutika wurden die Kulturzellen 72 Stunden lang inkubiert:

Bay g 7183	(25 ug/ml),
Halofuginoaceturat	(0,025 ug/ml),
Halofuginonhydrobromid	(0,025 ug/ml),
Halofuginonlactat	(0,025 ug/ml),
Parvaquone	(1 ug/ml).

Vor und nach der Chemotherapie wurde der prozentuale Anteil parasitenbefallener Lymphoblastoidzellen mittels der indirekten Immunfluoreszenz und nach Giemsafärbung bestimmt. Mit beiden Methoden wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt. Allerdings erwies sich der Immunfluoreszenztest als geringgradig empfindlicher, da mit diesem Test höhere Schizontenindices gefunden wurden. Während die Bay g 7183-Behandlung der Kulturzellen keine Änderung des Schizontenindex bewirkte, wurde der prozentuale Anteil der Parasiten-befallenen Lymphoblastoidzellen durch den Einfluß der Halofuginonsalze bzw. des Parvaquones deutlich verringert.
Ferner wurden bei behandelten und unbehandelten Kulturzellen die Anzahl der Schizontenpartikel und mit Hilfe einer Ethidium-Bromid- und Acridin-Orange-Färbung die Lebend-Tot-Verhältnisse ermittelt. Nach Inkubation mit Halofuginonsalzen bzw. Parvaquone war eine deutliche Verringerung der Anzahl von Schizontenpartikeln pro Zelle sowie ein relativer Anstieg toter Parasiten in lebenden Kulturzellen festzustellen. Bay g 7183 hatte weder Einfluß auf die Schizontenpartikelzahl noch konnte es die Lebend-Tot-Verhältnisse von Wirtszelle und Parasit wesentlich verschieben.
Um zu untersuchen, ob nach Einfluß der Chemotherapeutika die auf der Membran T. annulata-infizierter Zellen vermutete neue

Antigendeterminante weiterhin nachweisbar ist, wurden behandelte und unbehandelte Kulturzellen als Stimulatoren in einer Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) mit autologen und allogenen PBL als Responder inkubiert. Keine der benutzten Substanzen setzte die Fähigkeit der Kulturzellen herab, autologe und allogene PBL zu stimulieren.

Zur weiteren Charakterisierung wurden behandelte und unbehandelte Kulturzellen mit Concanavalin A (Con a), Phytohämagglutinin (PHA) und Pokeweed-Mitogen (PWM) stimuliert. Durch die Inkubation mit den Mitogenen konnte die bereits vorhandene starke Zellteilungsrate der Kulturzellen nicht zusätzlich erhöht werden. Auch nach der Chemotherapie besaßen die Kulturzellen eine unverändert hohe Mitoseaktivität und konnten daher nicht durch Con A, PHA und PWM stimuliert werden.

Die Theilerien-befallenen Kulturzellen wurden außerdem mit E-, EA- und EAC-Komplexen rosettiert. Hierbei zeigte sich, daß die Lymphozyten bereits 30 Tage nach der T. annulata-Infektion die Fähigkeit, E-, EA- und EAC-Rosetten zu bilden, verloren und diese nach der Einwirkung der Chemotherapeutika nicht zurückgewonnen hatten.

Summary

The influence of five chemotherapeutics on bovine lymphoblastoid cells infected with Theileria (T.) annulata was studied in vitro.
For 72 hours, the culture cells were incubated with the following chemotherapeutics:

Bay g 7183	(25 ug/ml),
Halofuginonaceturat	(0,025 ug/ml),
Halofuginonhydrobromide	(0,025 ug/ml),
Halofuginonlactat	(0,025 ug/ml),
Parvaquone	(1 ug/ml).

Before and after chemotherapy the proportion of lymphoblastoid cells infected with parasites was determined using indirect immunofluorescence and giemsa staining. With both methods comparable results were obtained, however the immunoflurescence test turned out to be slightly more sensitive, as with this test higher schizont indices were found.
A distinct decrease in the proportion of parasite infected cells was observed after incubation with Halofuginonsalts and Parvaquone. Treatment of culture cells with Bay g 7183 caused no alteration of the schizont index.
In treated and untreated cells the schizontparticles were counted and the viability of schizonts and host cells was evaluated by a fluorescence staining with ethidium-bromide and acridine-orange. After incubation with the Halofuginonsalts and Parvaquone a decrease of the number of schizont particles per cell and an increase of the proportion of dead parasites in living culture cells was noticed. Bay g 7183 had no influence on the number of schizontparticles and on the viability of host cells and their parasites.
Treated and untreated culture cells were incubated with autologous or allogeneic peripheral blood lymphocytes (PBL) in a

mixed lymphocyte reaction (MLR), in order to investigate, whether the new antigeneic determinant, which is presumed to be expressed on infected cells, is still demonstrable after chemotherapy. After treatment with the chemotherapeutics, the culture cells were still able to stimulate autologous or allogeneic PBL.

In addition, before and after chemotherapy Theileria-infected culture cells were incubated with concanavalin A (ConA), phytohaemagglutinin (PHA) and pokeweed-mitogen (PWM). The three mitogens had no enhancing effect on the proliferation of the treated and untreated lymphoblastoid cells.

The Theileria infected culture cells were tested for their ability to form rosettes by incubating with E-, EA- and EAC-complexes of sheep red blood cells. It was found that 30 days after the infection the cells had lost these characteristics and did not regain them after chemotherapy.

6. Literaturverzeichnis

Adler, S. (1952): Les piroplasmoses chez les bovides ex Israel.
Bull. Off. int. Epizoot. 38, 570-574

Ahmed, J.S., S.H.E. Kaufmann, H. Hahn (1981): Peritoneal exudate T-lymphocytes with specificity to sheep red blood cells.
IV. Fc-receptors on specific peritoneal exudate lymphocytes and their role in delayed-type hypersensitivity reactions.
Immunology 42, 185-190

Aichinger, G., A. Haberkorn, H. Kölling, E. Kranz, J. Reisdorf, J. Stoltefuß (1978): Anticoccidial activity of Bay g 7183.
Fourth Int. Congr. Parasit., Sect. D, 19-26 August 1978, Warsawa

Arend, W.P., M. Mannik (1973): The macrophage receptor for IgG: Number and affinity of binding sites.
J. Immun. 110, 1455-1463

Bach, F.H., N.K. Voynow (1966): One-way stimulation in mixed leucocyte cultures.
Science 153, 545-547

Bach, J.-F. (1973): Evaluation of T-cells and thymic serum factors in man using the rosette technique.
Transplantn. Rev. 16, 196-217

Bach, J.-F. (1976): Thymic hormones-from myths to facts.
Clin. Immun. Immunopath. 5, 3-8

Barnett, S.F. (1963): The biological races of the bovine Theileria and their host-parasite relationship, 180-195
In: Garnham, P.C.C., A.E. Pierce, J. Roitt: Immunity to protozoa.
Blackwell Scientific Publications, Oxford

Barnett, S.F. (1968): Theileriasis
In: Weinmann, D., M. Ristic, Infectious blood diseases of man and animals, 269-328.
Vol. II: The pathogens, the infections and the consequences, Academic Press, New York

Basten, A., N.L. Warner, T. Mandel (1972): A receptor for antibody on B-lymphocytes.
II.: Immunochemical and electronenmicroscopy characteristics.
J. exp. Med. 135, 627-642

Berken, A., B. Benacerraf (1966): Properties of antibodies cytophilic for macrophages.
J. exp. Med. 132, 119-144

Binns, R.M. (1978): Sheep erythrocyte rosettes in pigs, sheep, cattle and goats demonstrated in the presence of dextran.
J. immun. Meth. 21, 197-210

Boldt, D.H., J.P. Armstrong (1976): Rosette formation between human lymphocytes and sheep erythrocytes. Inhibition of rosette formation by specific glycopeptides.
J. clin. Invest. 57, 1068-1078

Boxel, J.A. van, D.L. Rosenstreich (1974): Binding of aggregated globulin to activated T-lymphocytes in the Guinea-pig.
J. exp. Med. 139, 1002-1012

Brocklesby, D.W., F. Hawking (1958): Growth of Theileria annulata and Theileria parva in tissue culture.
Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 52, 414-420

Brown, C.G.D., D.E. Radley, M.J. Burridge, M.P. Cunningham (1977a): The use of Tetracyclines in the chemotherapy of experimental East Coast fever (Theileria parva infection of cattle).
Tropenmed. Parasit. 28, 513-520

Brown, C.G.D., D.E. Radley, M.P. Cunningham, M. Kirimi, S.P. Morzaria, A.J. Musoke (1977b): Immunisation against East Coast fever (Theileria parva infection of cattle) by infection and treatment: Chemoprophylaxis with N-pyrrolidinomethyltetracycline.
Tropenmed. Parasit. 28, 542-548

Brown, C.G.D., D.A. Stagg, R.E. Purnell, G.K. Kanhai, R.C. Payne (1973): Infection and transformation of bovine lymphoid cells in vitro by infective particles of Theileria parva.
Nature, Lond. 245, 101-103

Burridge, M.J., C.D. Kimber (1973): Studies on colostral antibodies to Theileria parva using the indirect fluorescent antibody test.
Z. Tropenmed. Parasit. 24, 305-308

Buschmann, H., S. Pawlas (1980): Comparative studies on lymphocytes subpopulations of cattle and pigs.
Zentbl. Vet. Med. B. 27, 190-206

Cheers, M., J. Sprent (1973): B-lymphocytes as stimulators of a mixed lymphocyte reaction.
Transplantation 15, 336-337

Cichon, H.-H. (1979): Serologisch nachweisbare B-Lymphozyten spezifische Antigene beim Rind.
Vet. med. Diss., München

Cooper, M.D., D.Y. Perey, A.E. Gabrielsen, D.E.R. Sutherland, M.F. McKneally and R.A. Good (1968): Production of an antibody deficiency syndrome in rabbits by neonatal removal of organized intestinal lymphoid tissues.
Int. Archs Allergy appl. Immun. 33, 65-88

Curman, B., L. Östberg, L. Sandberg, I. Malmheden-Eriksson, G. Stalenheim, L. Rask, P.A. Peterson (1975):
H-2 linked Ss protein is C4 component of complement.
Nature, Lond. 258, 243-245

Dardenne, M., J. Charriere, J.-F. Bach (1978):
Alterations in thymocyte surface markers after in vivo treatment by serum thymic factor.
Cell. Immun. 39, 47-54

Delpy, L.P. (1949): Recherches effectuées en Iran sur Theileria annulata Dschunkowsky et Luhs et sa transmission dans les conditions naturelles ou experimentales.
Bull. Soc. Path. exot. 42, 285-294

Dickler, H.B. (1976): Lymphocyte receptor for immunglobulin.
Adv. Immun. 24, 167-214

Dschunkowsky, E., J. Luhs (1904): Die Piroplasmose der Rinder.
Centbl. Bakt. Parasitkde Abt. I 35, 486-491

Emery, D.L., P. McCullagh (1980): Immunological reactivity between chimeric cattle twins. Normal lymphocyte transfer.
Transplantation 29, 10-18

Emery, D.L., E.M. Eugui, R.T. Nelson, T. Tenywa (1981): Cell-mediated immune responses to Theileria parva (East Coast fever) during immunization and lethal infections in cattle.
Immunology 43, 323-336

Emery, D.L., W.J. Morrison (1980): Generation of autologous mixed leucocyte reactions during the course of infection with Theileria parva (East Coast fever) in cattle.
Immunology 40, 229-237

Eugui, E.M., D.L. Emery (1981): Genetically restricted cell-mediated cytotoxicity in cattle immune to Theileria parva.
Nature, Lond. 290, 251-253

Fearon, D.T. (1979): Regulation of the amplification C3 convertase of human complement by an inhibitory protein isolated from human erythrocyte membrane.
Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 76, 5867-5871

Fearon, D.T. (1980): Identification of the membrane glycoprotein that is the C3b receptor of the human erythrocyte, polymorphonuclear leucocyte, B lymphocyte and monocyte.
J. exp. Med. 152, 20-30

Ford, W.L. (1978): The preparation and labelling of lymphocytes
In: Weir, D.M.: Handbook of experimental Immunology.
Vol. II: Cellular Immunology, 23.1.-23.22. Blackwell, Scientific Publications, London

Fournier, C., J. Charriere (1978): Activation of human T cell subpopulation bearing receptors for autologous erythrocytes by concanavalin A.
J. Immun. 12, 771-776

Frese, K. (1983): In vitro-Untersuchungen zur Stimulation immunkompetenter Lymphozyten bei der Theileria annulata (Dschunkowsky und Luhs, 1904)-Infektion der Rinder. Vet. med. Diss., FU Berlin

Fridman, W.H., F.M. Kourilsky (1969): Stimulation of lymphocytes by autologous leukaemic cells in acute leukaemia. Nature, Lond. 224, 277-279

Fruchtmann, R., G. Uhlenbruck, D.O. Schmid, S. Cwik (1977): Zur Charakterisierung von T- und B-Lymphozyten beim Rind. Zentbl. Vet. Med. B. 24, 486-496

Garcia de Lima, E., E. Mitscherlich (1973): Untersuchungen über die Zahl der B- und T-Lymphozyten im strömenden Blut von gesunden, leukoseverdächtigen und leukosekranken Rindern der Deutschen Schwarzbunten. Zentbl. Vet. Med. B. 20, 665-684

Gill, B.S., Y. Bhattacharyulu, A. Singh, D. Kaur, H.S. Gill: Chemotherapy against Theileria annulata. In: Irvin, A.D., M.P. Cunningham, A.S. Young (1981): Advances in the control of theileriosis. Martinus Nijhoff, The Hague

Goldmann, M., E. Pipano (1978): Specific IgM and IgG antibodies in cattle immunized or infected with Theileria annulata. Tropenmed. Parasit. 29, 85-87

Gowans, J.L. (1975): The origin and development of lymphocytes. J. Reticuloendothel. Soc. 17, 97-98

Gray, M.A., C.G.D. Brown (1981): In vitro neutralization of theilerial sporozoite infectivity with immune serum.
In: Irvin, A.D., M.P. Cunningham, A.S. Young (1981): Advances in the control of theileriosis.
Martinus Nijhoff, The Hague

Grewal, A.S., L.A. Babiuk (1978): Bovine lymphocytes - an improved technique of E-rosette formation.
J. immun. Meth. 24, 355-361

Grewal, A.S., B.T. Rouse, L.A. Babiuk (1976): Erythrocyte rosettes - a marker for bovine T cells .
Can. J. comp. Med. 40, 298-305

Grimpet, J. (1937): Fièvre aphteuse et theileriose bovine.
Maroc. méd. 17, 417-421

Haberkorn, A., H.P. Schulz (1981): Experimental chemotherapy of mammalian coccidiosis with Bay g 7183.
Zentbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 250, 260-267

Hahn, H., S.H.E. Kaufmann (1981): The Role of cell-mediated immunity in bacterial infections.
Rev. infect. Dis. 3, 1221-1250

Han, T., J. Minowada (1973): A unique leucaemic T lymphoid cell line: absence of stimulating effect in mixed lymphocyte reaction.
Clin. exp. Immun. 15, 535-541

Hawking, F. (1963): Chemotherapy of theileriosis, 625-632.
In: Experimental chemotherapy,
Academic Press, New York

Henkart, P.A., R.J. Fisher (1975): Characterization of the lymphocyte surface receptors for Con A and PHA.
J. Immun. 114, 710-714

Higgins, D.A., M.J. Stack (1978): Some parameters of the erythrocyte-antibody-complement (EAC) rosette system for recognition of bovine B-cells.
J. Immun. Meth. 20, 211-224

Hulliger, L. (1965): Cultivation of three spezies of Theileria in lymphoid cells in vitro.
J. Protozool. 12, 649-655

Ikehara, S., Y. Hamaskima, T. Masuda (1975): Immunological restoration of both thymectomised and athymic nude mice by a thymus factor.
Nature, Lond. 258, 335-337

Janossy, G., M.F. Greaves (1971): Lymphocyte activation. I. response of T- and B-Lymphocytes to phytomitogens.
Clin. exp. Immun. 9, 483-498

Katz, D.H. (1977): Lymphocyte differentiation, recognition and regulation.
Academic Press, New York

Keller, R. (1977): Immunologie und Immunpathologie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Klein, J. (1975): Biology of the mouse histocompatibility-2 Complex.
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg

Koch, C.L. (1844): Systematische Übersicht über die Ordnung der Zecken.
Arch. Naturgesch. 9, 217-239

Kohlmeyer, G. (1983): Der Einfluß einiger Chemotherapeutika auf Theileria annulata (Dschunkowsky und Luhs, 1904) - Schizonten und die lymphoblastoiden Wirtszellen in vitro.
Vet. med. Diss., FU Berlin

Kuntz, M.M., J.B. Innes, M.E. Weksler (1976): Lymphocyte transformation induced by autologous cells. IV. Human T-lymphocyte proliferation induced by autologous or allogeneic non T-lymphocytes.
J. exp. Med. 143, 1042-1054

Lachmann, P.J., D. Grennan, A. Martin, P. Démant (1975): Identification of Ss protein as murine C4.
Nature, Lond. 258, 242-243

Langmann, R.E. (1978): Cell-mediated immunity and the major histocompatibility complex.
Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 81, 7-37

Lazary, S., E. Rivera, A.L. De Weck, H. Gerber, J. Nicolet (1974): In vitro stimulation of bovine leucocytes by phytohaemagglutinin and other mitogens.
Res. vet. Sci. 17, 344-350

Leino, A., O. Lassila, E. Soppi, O. Ruuskanen, T. Hirvonen, P. Toivanen (1977): Thymosin-induced differentiation of fetal lymphocytes in sheep and man, 147-154.
In: Solomon, J.B., J.D. Horton: Developmental immunobiology,
Elsevier, Amsterdam

Lohrmann, H.D., J. Whang-Peng (1974): Human mixed leucocyte culture: Identification of the proliferating lymphocyte subpopulation by sex chromosome markers.
J. exp. Med. 140, 54-60

Maclaurin, B.P. (1972): Thymus origin of lymphocytes reacting and stimulating reaction in mixed lymphocyte cultures -studies in the rat.
Clin. exp. Immun. 10, 649-659

McDevitt, H.O., K.B. Bechtol, G.J. Hämmerling, P. Lonai, T.L. Delovitch (1974): Ir genes and antigen recognition, 597-632.
In: Sercarc, E.E., A.R. Williamson, C.F. Fox: The immune system. Genes, receptors, signals.
Academic Press, New York

McHardy, N. (1979): Experimental therapy of theileriosis.
Jl. S. Afr. vet. Ass. 50, 321-322

McHardy, N., A.J.B. Haigh, T.T. Dolan (1976): Chemotherapy of Theileria parva infection.
Nature, Lond. 261, 698-699

Morgan, D.W., N. McHardy (1982): Comparison of the antitheilerial effect of Wellcome 993 C and halofuginone.
Res. vet. Sci. 32, 84-88

Muhammed, S.J., L.H. Lauermann, L.W. Johnson (1975): Effect of humoral antibodies on the course of Theileria parva infection (East Coast fever) of cattle.
Am. J. vet. Res. 36, 399-402

Muscoplat, C., J. Alhaji, D.W. Johnson, K.A. Pomeroy, J.M. Olson, V.L. Larson, J.B. Stevens, D.K. Sorensen (1974): Characteristics of lymphocyte responses to phytomitogens: Comparison of responses of lymphocytes from normal and lymphocytotic cows.
Am. J. vet. Res. 35, 1054-1055

Neitz, W.O. (1950): The specific action of Pamaquin on the haemotropic parasites of Theileria parva.
S. Afr. J. Sci. 46, 218-219.

Neitz, W.O. (1951): Chemotherapeutic studies on theileriasis in cattle.
S. Afr. Biol. Soc. 15, 50-51

Neitz, W.O. (1953): Aureomycin in Theileria parva infection.
Nature, Lond. 171, 34-35

Neitz, W.O. (1957): Theileriosis, gonderiosis and cytauxzoonoses: a review.
Onderstepoort J. vet. Res. 27, 275-430

Nowell, P.C. (1960): Phythaemagglutinin an initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes.
Cancer Res. 20, 462-466

Opelz, G.M., M. Kiuchi, A. Takasugi, P.J. Terasaki (1975): Autologous stimulation of human lymphocyte subpopulation.
J. exp. Med. 142, 1329-1335

Owen, J.J. T. (1972): The origins and development of lymphocyte populations.
In: Ontogeny of acquired immunity, 35-54,
Ciba Foundation Symposium,
Elsevier, Amsterdam

Pearson, T.W., R.S. Hewett, G.E. Roelants, D.A. Stagg, T.T. Dolan (1982): Studies on the induction and specificity of cytotoxicity to Theileria-transformed cell lines .
J. Immun. 128, 2509-2513

Pearson, T.W., B. Lundin, T.T. Dolan, D.A. Stagg (1979a): Cell-mediated immunity to Theileria-transformed cell lines.
Nature, Lond. 281, 678-680

Pearson, T.W., G.E. Roelants, L.B. Lundin, K.S. Mayor-Whithey (1979b): The bovine lymphoid system: Binding and stimulation of peripheral blood lymphocytes by lectins.
J. immun. Meth. 26, 271-282

Pereponov, G.A., P.A. Nechaev (1963): Treatment of Theileria infection in cattle with Quinocide (Primaquin) combined with Bigumal (Mepacrine).
Mater. Konf. Probl. Prot., 82-84
Ref. i. Vet. Bull., Weybridge 34, 459 (1964)

Pinder, M., S. Kar, K.S. Withey, L.B. Lundin, G.E. Roelants (1981): Proliferation and lymphocyte stimulatory capacity of Theileria infected lymphoblastoid cells before and after the elimination of the intracellular parasites.
Immunology 44, 51-60

Pipano, E. (1974): Immunological aspects of Theileria annulata infection.
Bull. Off. int. Epizoot. 81, 139-159

Pipano, E. (1976): Basic principles of Theileria annulata control, 55-65.
In: Henson, J., B. Campbell: Theileriosis, International Development.
Research Centre 1977, Ottawa

Pipano, E., M. Cahana (1968): Measurement of the immune response to vaccine from tissue cultures of Theileria annulata by the fluorescent antibody test.
J. Protozool. 15, Suppl. 45

Plate, J.M.D., J.F.C. McKenzie (1973): 'B'-cell stimulation of allogeneic T-cell proliferation in mixed lymphocyte cultures.
Nature new Biol. 245, 247-249

Pomerantzev, B.J. (1946): Lestiques (Ixodidae) de la faune de l'URSS et des pays limitrophes.
Opred. Faune SSSR 26, 28pp (in Russisch)

Preston, P.M. (1981): The role of macrophages in protective immunity and immunosuppression in bovine theilerioses, 354
In: Irvin, A.D., M.P. Cunningham, A.S. Young (1981): Advances in the control of theilerioses,
Martinus Nijhoff, The Hague

Preston, P.M., C.G.D. Brown, R.L. Spooner (1983): Cell-mediated cytotoxicity in Theileria annulata infection of cattle with evidence for BoLA restriction,
Clin. exp. Immun. 53, 88-100

Radkevich, P.E. (1960): Combined therapy with antibiotics and chemotherapeutic agents of Theileria annulata infection in cattle.
Veterinariya, Moscow No. 6, 23-25
Ref. i. Vet. Bull., Weybridge 31, 125 (1961)

Radkevich, P.E. (1961): Specific and symptomatic therapy in Theileria annulata infection in cattle.
Veterinariya, Moscow No. 5, 26-28
Ref. i.Vet. Bull., Weybridge 31, 639 (1961)

Radkevich, P.E. (1966): Pharmacotherapy of Theileria annulata infection in cattle.
Dokl.vses. Akad. sel'khoz. Nauk. No. 7, 41-42
Ref. i.Vet. Bull., Weybridge 37, 161 (1967)

Rafyi, A., G. Maghami, P. Houshmand (1965): Sur la virulence de Theileria annulata (Dschunkowsky et Luhs, 1904) et la prémunition contre la Theileriose bovine en Iran.
Bull. Off. int. Epizoot. 64, 431

Reeves, J.H., H.W. Renshaw (1978): Surface membrane markers on bovine peripheral blood lymphocytes.
Am. J. vet. Res. 39, 917-923

Rehbein, G. (1981): Charakterisierung und Funktion peripherer Blutlymphozyten bei der Immunantwort Theileria annulata -(Dschunkowsky und Luhs, 1904) infizierter Kälber.
Vet. med. Diss., FU Berlin

Rehbein, G., J.S. Ahmed, E. Schein, F. Hörchner, E. Zweygarth (1981b): Immunological Aspects of Theileria annulata Infection in Calves
2. Production of macrophage migration inhibition factor (MIF) by sensitized lymphocytes from Theileria annulata-infected calves.
Tropenmed. Parasit. 32, 154-156

Rehbein, G., J.S. Ahmed, E. Zweygarth, E. Schein, F. Hörchner (1981a): Immunological Aspects of Theileria annulata Infection in Calves
1. E., EA, and EAC rosette forming cells in calves infected with T. annulata.
Tropenmed. Parasit. 32, 67-128

Sakane, T., J. Green (1979): Specificity and suppressor function of human T-cells responsive to autologous non-T cells.
J. Immun. 123, 584-589

Samish, M., E. Pipano (1976): Transmission of Theileria annulata by two and three host ticks of the genus Hyalomma (Ixodidae), 371-372.
In: Wilde, J.K.A.: Tick borne diseases and their vectors. Proc. Int. Conf., 27 September - 1 October 1976, Edinburgh.
Univ. Edinburgh, Centre for Trop. vet. Med., 1978.

Schein, E. (1976): Zum Entwicklungszyklus von Theileria annulata (Dschunkowsky und Luhs, 1904) in der Überträgerzecke Hyalomma anatolicum excavatum (Koch, 1844).
Habil. Schr., FU Berlin

Schein, E., W.P. Voigt (1979): Chemotherapy of bovine theileriosis with halofuginone.
Acta trop. 36, 391-394

Schmid, D.O., S. Cwik (1972): On leucocyte serology in pig and cattle.
13th Europ. Conf. Anim. Blood Grps. 26.6.-1.7.1972.

Schmid, D.O., F. Otto (1970): Contribution to serology of lymphocytes in cattle and pigs.
12th Europ. Conf. Anim. Blood Grps. 6.-11.7.1970

Schulze, P. (1919): Bestimmungstabelle für das Zeckengenus Hyalomma Koch.
Sber. Ges. naturf. Freunde Berl. 5, 189-196

Sell, S., C. Raffel, C.B. Scott (1980): Tissue localization of T and B lymphocytes in lagomorphs: anatomical evidence for a major role of the gastrointestinal associated lymphoid tissue in generation of lymphocytes in the adult.
Dev. comp. Immun. 4, 355-366

Sergent, E., A.Donatien, L. Parrot, F. Lestoquard (1932): Suppression experimentelle de la repoduction senée chez un hematozoaire Theileria dispar.
C.r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris 195, 1054-1056

Sergent, E., A. Donatien, L. Parrot, F. Lestoquard (1945): Etudes sur les piroplasmoses bovines.
Inst. Pasteur d'Algèrie, 816 pp, Algér

Shannon, E.J., R.C. Hastings (1977): Methods for the identification of human-B-lymphocytes.
J. Immun. Meth. 18, 321-336

Sharon, N. (1976): Lectins as mitogens, 31-41.
In: Oppenheimer, J.J., D.L. Rosenstreich: Mitogens in immunbiology.
Academic Press, New York

Shreffler, D.C., C.S. David (1975): The H-2 major histocompatibility complex and the I immune response region: genetic variation function and organization.
Adv. Immun. 20, 125-195

Sieckmann, D.G. (1980): The use of anti-immunglobulins to induce a signal for cell division in B-lymphocytes via their membrane IgM and IgD.
Immun. Rev. 52, 181-210

Singh, D.K., S. Jagdish, O.P. Gautam (1977): Cell mediated immunity in tropical theileriasis (Theileria annulata infection).
Res. vet. Sci. 23, 391-392

Spooner, R.L., C.G.D. Brown (1980): Bovine lymphocyte antigens (BoLA) of bovine lymphocytes and derived lymphoblastoid lines transformed by Theileria parva and Theileria annulata.
Parasite Immun. 2, 163-174

Spooner, R.L., H. Leveziel, F. Grosclaude, R.A. Oliver, M. Vaimann (1978): Evidence for a possible major histocompatibility complex (BLA) in cattle.
J. Immunogenetics 5, 335-346

Spooner, R.L., R.A. Oliver, D.J. Sales (1979): Analysis of alloantisera against bovine lymphocytes.
Joint report of the 1st International Bovine Lymphocyte Antigen (BoLA) Workshop.
Anim. Blood Groups Biochem. Genetics, 10, 63

Takacs, B.J. (1980): Characterization of functional Fc receptor material from human lymphoblastoid cell lines. 1. Large scale purification and biochemical analysis.
Molec. Immun. 17, 1293-1314

Tchernomoretz, J. (1945): Multiplication in vitro of Koch bodies of Theileria annulata.
Nature, Lond. 156, 391-393

Tizard, I.R. (1981): Einführung in die veterinärmedizinische Immunologie.
Paul Parey Verlag, Berlin, Hamburg.

Tomonari, K., A. Wakisaka, M. Aizawa (1980): Self recognition by autologous mixed lymphocyte reaction-primed cells.
J. Immun. 125, 1596 - 1600

Tsur, J., S. Adler (1962): Cultivation of T. annulata schizonts in monolayer tissue cultures.
Refuah vet. 19, 224-225

Usinger, W.R., M. Curie-Cohen, W.H. Stone (1977): Lymphocyte defined loci in cattle.
Science 196, 1017-1018

Wardley, R. (1977): An improved E rosetting technique for cattle.
Br. vet. J. 133, 432-434

Weksler, M.E. (1973): Lymphocyte transformation induced by autologous cells.
II. Stimulation by Mitogen induced Lymphoblasts.
J. exp. Med. 137, 799

Weksler, M.E., C.E. Moody, R.W. Kozak (1981): The autologous mixed lymphocyte reaction,
Adv. Immun. 31, 271-308

Wiesenhütter, E. (1965): Untersuchungen der Theileriose und anderer Blutinfektionen bei Rindern in Syrien.
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 78, 31-32

Zinkernagel, R.M. (1978): Speculations on the role of major transplantation antigens in cell-mediated immunity against intracellular parasites.
Curr. Top. Microbiol. Immun. 82, 113-138

Zinkernagel, R.M. (1979): Review: Cellular immune responses to intracellular parasites: role of the major histocompatibility gene complex and thymus in determining immune responsiveness and susceptibility to disease.
Parasite Immun. 1, 91-109

Zweygarth, E., J.S. Ahmed, G. Rehbein, W.P. Voigt (1983): Cell-mediated immune response to Babesia equi-transformed lymphoblastoid cells in vitro.
Zentbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. A 254, 281-289

Die Zeitschriften wurden abgekürzt nach:

World list of scientific periodicals, published in the years 1900-1960, 4. Auflage, hrsg. von Peter Brown, George Burder Stratton, Volume 1-3, London, Butterworths, 1965.

World list of scientific periodicals, new periodical titles 1960-1968, hrsg. von Kenneth I. Porter, C.J. Koster, London, Butterworths, 1970.

Herrn Prof. Dr. E. Schein danke ich herzlich für die Überlassung des Themas.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. F. Hörchner für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die Beratung bei der Abfassung der Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. J.S. Ahmed für die freundschaftliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und für seine stets geduldig gewährten Ratschläge.

Danken möchte ich auch allen Mitarbeitern des Institutes, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

LEBENSLAUF

Sabine Sanft

geboren	: 4.6.1957 in Berlin
Vater	: Dr. Hans-Werner Sanft, Tierarzt
Mutter	: Christel Sanft, geb. Madel, Tierärztin
1964-1968	: Besuch der Mühlenau-Grundschule in Berlin-Zehlendorf
1968-1976	: Besuch des Gymnasium Steglitz in Berlin
Juni 1976	: Abitur
1976-1982	: Studium der Tiermedizin an der FU Berlin
Februar 1982	: Ablegung des Staatsexamens und Approbation als Tierärztin
seit Juni 1983	: Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der FU Berlin